

DISEÑO DE EXPERIMENTO PARA DETECTAR EL NIVEL DE PROBIOTICOS EN CEREALES INFANTILES EN MOLINOS Y PILADORAS PETER S.A.S. CON BASE EN TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

DESIGN OF EXPERIMENT TO DETECT THE LEVEL OF PROBIOTICS IN CHILDREN'S CEREALS IN MOLINOS Y PILADORAS PETER S.A.S. BASED ON MICROBIOLOGICAL TECHNIQUES

Madeley Campo Salas*
Eliana Mesino Suarez**
Leidy Pinedo Hernández***

DOI: <https://doi.org/10.18041/1909-2458/ingeniare.26.6566>

RESUMEN

En este artículo se plantea un diseño experimental 2^k donde se evalúan las concentraciones de microorganismos probióticos en los cereales infantiles que actualmente se comercializan en el mercado. Los ensayos se llevaron a cabo en un laboratorio de Biotecnología donde se realizó la interacción de los siguientes factores: tipo de microorganismo, temperatura y tipo de siembra, los cuales fueron probados en una simulación en el tracto digestivo y metodología basada en el tipo de siembra directa e indirecta en los medios de cultivos específicos con un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) para la identificación de los niveles de crecimiento del *Bifidobacterium Lactis* y *Bacillus Coagulans*. En esta práctica, se demuestra que el probiótico "Bacillus Coagulans" es de fácil detección en la siembra directa; a diferencia del "Bifidobacterium Lactis" que no tienen un crecimiento de bacterias ácido láctica con ninguna de las dos siembras utilizadas, lo que significa que hubo resistencia para la generación de unidades formadoras de colonias (UFC). Cabe resaltar que los "Microorganismos Probióticos" en los cereales infantiles deben estar presente en toda la vida útil del producto y ser de fácil liberación. Es por esto, que los factores que mejor intervienen en las UFC son fijados a una temperatura de 37°C y basados en una metodología indirecta para la obtención de recuentos de bacterias ácido láctico.

Palabras Clave:

Diseño de experimentos; Probióticos; Técnica Microbiológica

Cómo citar este artículo:

M. Campo, E. Mesino & L. Pinedo. Diseño de experimento para detectar el nivel de probioticos en cereales infantiles en Molinos y Piladoras Peter S.A.S. con base en técnicas microbiológicas. *Ingeniare*, Año 15, No. 26, Junio 2019. pp. 55 - 67.

*Ingeniera Industrial. Máster en Dirección de Empresa (MBA). Especialista en Ingeniería de la Calidad. Banco Serfinanza. Correo: : madecampo93@hotmail.com

**Microbióloga. Especialista en Ingeniería de la Calidad. Entidad vinculada: Molinos y Piladoras S. A. S. Correo: leidy907@outlook.com

***Ingeniero Electrónico y Telecomunicaciones. Especialista en Ingeniería de la Calidad. CSP TUBO 360 LTD. Correo: emesino@gmail.com

ABSTRACT

In this article, the design proposed by the authors is a 2^k experimental, evaluating the concentrations of probiotic microorganisms in infant cereals currently on the market. The tests were carried out in a Biotechnology laboratory where the interaction of the following factors was carried out: type of microorganism, temperature and type of planting, which were tested in a simulation in the digestive tract and methodology based on the type of planting direct and indirect in specific culture media with a count of colony forming units (CFU) for the identification of growth levels of *Bifidobacterium Lactis* and *Bacillus Coagulans*. In this practice, it is indicated that the probiotic "Bacillus Coagulans" is easy to detect in direct seeding; unlike "Bifidobacterium Lactis" which do not have a growth of lactic acid bacteria with any of the two seeds used, which means that there was resistance to the generation of colony forming units. It should be noted that the "Probiotic Microorganisms" in infant cereals must be present throughout the shelf life of the product and be easily released. For this reason, the factors that best intervene in CFUs are set at a temperature of 37°C and based on an indirect methodology for obtaining lactic acid bacteria counts.

Keywords:

Design of experiments; Probiotics; Microbiological Technique

Fecha de recepción: 21 de marzo de 2018 • Fecha de aceptación: 30 de mayo de 2018

INGENIARE, Universidad Libre-Barranquilla, Año 15, No. 26, pp. 55-67 • ISSN: 1909-2458

1. INTRODUCCION

Según la OMS, probióticos son microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo. En particular, una de las principales funciones de los probióticos es la de mantener el equilibrio en la microflora intestinal. [1]

De acuerdo a lo anterior, es sumamente importante la incorporación de ingredientes funcionales en la elaboración de alimentos infantiles bajo ciertas condiciones experimentales, debido a la variedad de cepas prebióticas que agregan valor y beneficios en la prevención de enfermedades gastrointestinales.

Hoy en día existen investigaciones previas que han demostrado un avance considerable y notable en la selección y caracterización de cultivos probióticos, justificando las propiedades saludables en relación con el consumo en los infantes conforme a la consulta de expertos FAO/OMS sobre evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los prebióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con Bacterias vivas del ácido láctico [2].

En este estudio se pretende identificar el nivel de microorganismos (unidades formadoras de colonias) probióticos "Bifidobacterium Lactis y Bacillus Coagulans" presentes en el cereal infantil, empleando técnicas microbiológicas basada en la metodología del tipo de siembra directa e indirecta con una velocidad y tiempo de permanencia bajo condiciones simuladas del tracto digestivo. Las muestras utilizadas para este experimento se seleccionaron con una vida útil de 1,6 meses, humedad del 2% al 5% y temperaturas de almacenamiento de 30°C hasta 40°C. Los tipos de microorganismos, la temperatura y tipo de siembra se consideran factores de interacción del experimento.

4. REVISION DE LA LITERATURA

Lilly y Stillwel, propusieron el término probiótico como un antónimo del término antibiótico, fueron los primeros que describieron los probióticos como ciertos microorganismos vivos no patógenos que incluían alguna flora bacteriana, la cual tiene un efecto benéfico en la salud del huésped y en la prevención de la enfermedad y/o sirven como tratamiento [3].

Un alimento puede considerarse funcional, sí influye positivamente en el organismo, proporcionado un mejor estado de salud, bienestar y/o reduce el riesgo de padecer alguna enfermedad [4]. El orden de introducción de los alimentos debe hacerse progresivamente para valorar la aparición de reacciones adversas y para que el niño se acostumbre al cambio de sabores y texturas. Los Cereales han sido utilizados como vehículos de en el desarrollo y producción de alimentos funcionales. Los aportes que suministran en proteína, carbohidratos, vitaminas y minerales son una alternativa más para emplearse como complementos en la alimentación de los niños. Los cereales más empleados son a base de: arroz, maíz, avena, trigo, cebada, quinua, soya, etc. [5]. Los probióticos son complementos dietéticos que contienen cultivos vivos de bacterias y levaduras beneficiosas para las funciones cólicas y del huésped [6].

Los microorganismos deben cumplir con características específicas para que sean considerados como probióticos; algunas características son: resistencia al ácido o a la bilis, adhesión a las células intestinales presentes en los humanos, ser seguros en el momento

del consumo, inhibir bacterias patógenas, poder colonizar el intestino [7] .

La mayoría de los probióticos pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas tales como: Lactobacilos, Streptococcus y Bifidobacterias, las cuales son componentes fundamentales del ecosistema intestinal [8].

La especie de Lactobacillus son bacilos gram positivas no esporuladas, no móviles, anaerobias, facultativas productoras de ácido láctico por fermentación de la glucosa y constituyen el 1% de la microflora intestinal. Las Bifidobacterias son bacterias gram positivas, no esporuladas, no móviles, anaerobias obligadas, que producen ácido acético y láctico por la fermentación de la glucosa y representan el 10 % de la microflora del adulto y el 90% de la recién nacido alimentado con leche materna [9].

Los probióticos modifican la composición de la flora entérica en forma directa aumentando la población de comensales específicamente lactobacilos y/o Bifidobacterias, por la eliminación de patógenos relacionados con la inflamación o la fermentación bacteriana. La reducción de la fermentación bacteriana modula la composición de la flora intestinal y contribuye a aliviar los síntomas asociados al aumento de la producción de gas intestinal [10].

Los probióticos comercializados son muy variables. Algunos productos indican en su etiqueta que contienen un solo tipo de microorganismos, mientras que en otros se afirma que contienen muchos tipos distintos. Sin embargo, los estudios para verificar la composición de las formulaciones probióticas comercializadas han observado discrepancias con frecuencia (en al menos el 30-40% de los productos) entre lo que se afirma y el número real de microorganismos viables, la concentración de microorganismos y/o sus tipos presentes en el producto en comparación con el etiquetado del mismo. Además, algunos probióticos comercializados se etiquetan con nombres de microorganismos que tienen una taxonomía incorrecta o que son ficticios. Por tanto, existe una incertidumbre considerable sobre la composición y fiabilidad de las preparaciones probióticas disponibles en la actualidad [11].

El método para distinguir las células viables y no viables se logra en los recuentos de Placa estándar o recuento de microorganismos viables en medios de cultivos sólidos dispensados en cajas de petri, incubando y posteriormente realizando el conteo de las colonias viables. Para la realización del conteo de microorganismo se realiza por diferentes tipos de siembra o condiciones para liberación y posterior identificación de los microorganismos.

La técnica más usada en el laboratorio de microbiología es probablemente la transferencia de un ambiente a otro con propósito de cultivarlos. Para determinar los caracteres de cultivos de las bacterias, hongos y otros cultivables. Existen varios métodos para aislar la bacteria en cultivo puro con el fin de evaluar sus características en estos medios.

La siembra directa que es la forma de obtener los microorganismos presentes en una muestra con medio nutritivo o en un medio selectivo para la identificación de un microorganismo específico. La siembra indirecta o de enriquecimiento no es más que dar las condiciones necesarias para activar o enriquecer al microorganismo a identificar bajo los

medios de cultivos específicos para este fin [12] .

Diluciones Seriadas, Con esta metodología y con el objetivo de reducir el error estadístico, se recomienda realizar suficientes réplicas de las mismas diluciones, así como de las diferentes diluciones a realizar. En este tipo de conteo de viables, las colonias no siempre han de proceder de una sola célula, dado que algunas bacterias pueden formar agrupaciones y estas serán las que darán origen a la colonia; por lo anterior los reportes de esta metodología se refieren a “unidades formadoras de colonia” o UFC; Unidad que corresponde como mínimo a una bacteria formando una colonia, así como también a un grupo de estas que ha sido las formadoras de la misma [12].

3. METODOLOGIA

La realización de esta experiencia se dividió en dos fases: la primera consistió en el análisis de muestras en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Cauca (Colombia;) y la segunda en el desarrollo y análisis del experimento en las instalaciones de la empresa Molinos y Piladoras Peter S.A.S. Las dos muestras comerciales de cereal infantil se identificaron con el número de lote y la fecha de vencimiento respectivamente: 8070007809 – 01/09/2019 y 6194007802 -03/12/2018.

Tabla 1.Variables de entrada del diseño

Factores	Bajo	Alto	Unidades	Continuo
Tipo de microorganismo	Lactis	Coagulans	Microorganismo	No
Metodología (tipo de siembra)	Indirecta MP	Directa MP	NA	No
Tipo de microorganismo	30,0	37,0	°C	Si

Fuente: Elaboración de los autores

Se estableció un diseño con tres factores experimentales correspondientes al tipo de microorganismo, metodología (tipo de siembra) y temperatura. Dónde cada factor se encuentra asociado a dos niveles como se describe en la Tabla 1. La variable de respuesta a este diseño son las unidades formadoras de colonias detectadas en cada uno de los microorganismos. Otro aspecto a considerar en el experimento hace referencia a los factores de ruido tales como: Experiencia del trabajador, y herramientas utilizadas. Dentro de los elementos usados se contemplaron los siguientes: balanza analítica, medios de cultivos, incubadoras, olla esterilizadora, beaker, caja de petri, agitadora y frascos schott.

La siembra directa, consiste en un caldo nutritivo incubado, que sirve para detectar el recuento de unidades formadoras de colonias de: bacterias, hongos y levaduras; aunque por la siembra directa no todas las veces se obtienen resultados satisfactorios. Mientras que la siembra indirecta radica en el aporte de nutrientes necesarios al microorganismo a unas condiciones ya predeterminadas con respecto a la velocidad y temperatura.

Con los resultados obtenidos del experimento se realizó un análisis estadístico por medio del software Statgraphics, permitiendo determinar la significancia de cada uno de los factores para la mayor obtención de unidades formadoras de colonias.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Caracterización Microbiológica del Cereal Infantil a Base de Harinas

La caracterización microbiológica completa del Cereal infantil se realizó mediante siembra directa para detectar bacterias ácido láctico. Las muestras fueron sometidas a un análisis microbiológico convencional donde se aplicó la técnica de dilución seriada y siembra en placa para determinar la presencia de Bacterias ácido lácticas, Mesófilos, Mohos y Levaduras. Las Bacterias Acido Lácticas fueron incubadas por 72 horas a 30°C y 37°C, y para el caso de Mohos y Levaduras se incubaron por 6 días a 25°C.

Tabla 2. Recuento de bacterias de hongos y levaduras

Prueba	Dilución	Cuento de Colonias		
Detección de Bacterias Ácido Lácticas	-1	0	0	0
	-2	0	0	0
	-3	0	0	0
	-4	0	0	0
	-5	0	0	0
	-1	0	0	0
	-2	0	0	0
	-3	0	0	0
	-4	0	0	0
	-5	0	0	0
	-1	0	0	0
	-2	0	0	0
	-3	0	0	0
	-4	0	0	0
	-5	0	0	0
Mesófilos	-1	0	0	0
	-2	0	0	0
	-3	0	0	0
	-4	0	0	0
	-5	0	0	0
	-1	0	0	0
	-2	0	0	0
	-3	0	0	0
	-4	0	0	0
	-5	0	0	0
	-1	0	0	0
	-2	0	0	0
	-3	0	0	0
	-4	0	0	0
	-5	0	0	0

Fuente: Elaboración de los autores

Por medio de la siembra directa, se muestran que los parámetros de Mesófilos, Mohos y levaduras están dentro de límite establecido dentro del control microbiológico. Pero, con respecto a las Bacterias Acido Lácticas no se evidencia crecimiento alguno. En la Tabla 2 se describen los recuentos obtenidos de bacterias de hongos y levaduras.

Como testigos del experimento se empleó una muestra comercial; el producto N° 1 es un cereal comercial que tiene una apariencia muy similar a la presentada por la empresa (MP) con la diferencia que se reporta a *Bacillus coagulans* como bacteria probiótica impregnada. En la Tabla 3 se puede observar el crecimiento bacteriano del producto analizado, alcanzando un conteo promedio de $1,0 \cdot 10^5$ al 30°C y de $1,1 \cdot 10^5$ a 37°C para el cereal infantil.

Tabla 3. Datos del crecimiento bacteriano del *Bacillus Coagulans* en el cereal

Prueba	Dilución	Conteo de Colonias		
Detección de <i>Bacillus coagulans</i> en Cereal Infantil	-1	>300	>300	>300
	-2	>300	>300	>300
	-3	53	41	48
	-4	3	4	5
	-5	0	0	0
	-1	>300	>300	>300
	-2	>300	>300	>300
	-3	37	43	36
	-4	3	4	5
	-5	0	0	0
	-1	>300	>300	>300
	-2	>300	>300	>300
	-3	35	28	33
	-4	1	0	0
	-5	0	0	0

Fuente: Elaboración de los autores

En el caso de la siembra indirecta, la muestra MP es sembrada en un cultivo de enriquecimiento específico para detectar bacterias ácido lácticas (*Bifidobacterium lactis*) en este proceso consiste en someter la muestra a un proceso de agitación a 200 rpm durante 22 horas en caldo MRS.

Teniendo en cuenta los primeros resultados se realizó una prueba adicional para establecer la presencia o no de *Bifidobacterium lactis* en las muestras del Cereal infantil objeto de análisis. En la Tabla 4 se observa que bajo estas condiciones si fue posible obtener un crecimiento del microorganismo observándose crecimiento de colonias hasta la dilución 10^{-4} ; alcanzando un conteo promedio de $1,7 \cdot 10^5$ UFC/mL.

4.2. Diseño de Experimento para la Identificación y Concentración de los Microorganismos Probióticos

Siendo un experimento 2k se configuraron los siguientes parámetros del diseño en el software Statgraphics para obtención de la variable de respuesta (Unidades Formadoras de Colonias). Ver Tabla 5.

Tabla 4. Recuento microbiológico en fase de pre enriquecimiento

Muestra	Dilución	Conteo de Colonias		
1	-1	>300	<300	<300
	-2	>300	<300	<300
	-3	170	180	185
	-4	20	23	25
	-5	0	0	0
2	-1	>300	<300	<300
	-2	>300	<300	<300
	-3	168	163	170
	-4	18	13	16
	-5	0	0	0

Fuente: Elaboración de los autores

Tabla 5. Parámetros del diseño

Descripción del Parámetro	Cantidad
Factores experimentales:	3
Bloques:	3
Variable de respuesta:	1
Corridas:	24
Grados de libertad para el error:	16

Fuente: Elaboración de los autores

En la Tabla 6 se puede observar el número de corridas (24) o réplicas (2) realizadas de forma aleatoria con las diferentes interacciones entre los factores experimentales y sus respectivos niveles.

Tabla 6. Número de corridas e interacción de factores

Replica	Tipo de Microorganismo	Tipo de Metodología	Temperatura (°C)	Unidades formadoras
1	LACTIS	DIRECTA MP	37	0
1	COAGULANS	DIRECTA MP	37	0
1	COAGULANS	INDIRECTA MP	37	170000
1	LACTIS	INDIRECTA MP	30	1100000
1	LACTIS	DIRECTA MP	30	0
1	COAGULANS	INDIRECTA MP	30	140000
1	LACTIS	INDIRECTA MP	37	1500000
1	COAGULANS	DIRECTA MP	30	0

Fuente: Elaboración de los autores

Tabla 6. Número de corridas e interacción de factores (Continuación)

Replica	Tipo de Microorganismo	Tipo de Metodología	Temperatura (°C)	Unidades formadoras
2	LACTIS	DIRECTA MP	37	0
2	COAGULANS	DIRECTA MP	37	0
2	COAGULANS	INDIRECTA MP	37	200000
2	LACTIS	INDIRECTA MP	30	1300000
2	LACTIS	DIRECTA MP	30	0
2	COAGULANS	INDIRECTA MP	30	140000
2	LACTIS	INDIRECTA MP	37	1700000
2	COAGULANS	DIRECTA MP	30	0
3	LACTIS	DIRECTA MP	37	0
3	COAGULANS	DIRECTA MP	37	0
3	COAGULANS	INDIRECTA MP	37	170000
3	LACTIS	INDIRECTA MP	30	1300000
3	LACTIS	DIRECTA MP	30	0
3	COAGULANS	INDIRECTA MP	30	140000
3	LACTIS	INDIRECTA MP	37	1700000
3	COAGULANS	DIRECTA MP	30	0

Fuente: Elaboración de los autores

Al correr el experimento en Statgraphics se obtiene el análisis de varianza y los efectos estimados de modelo como se describen en la Tabla 7 y Tabla 8 respectivamente.

Tabla 6. Parámetros del diseño (Continuación)

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: TIPO DE MICROORGANISMO	2,43207E12	1	2,43207E12	721,50	0,0000
B: METODOLOGIA	3,80807E12	1	3,80807E12	1129,71	0,0000
C: TEMPERATURA	7,26E10	1	7,26E10	21,54	0,0003
AB	2,43207E12	1	2,43207E12	721,50	0,0000
AC	4,86E10	1	4,86E10	14,42	0,0016
BC	7,26E10	1	7,26E10	21,54	0,0003
ABC	4,86E10	1	4,86E10	14,42	0,0016
Error total	5,39333E10	16	3,37083E9		
Total (corr.)	8,96853E12	23			

Fuente: Elaboración de los autores

Se puede inferir que los p-valor para cada uno de los factores y efectos son menores a 0,05, lo que significa que todos son significativos en el modelo.

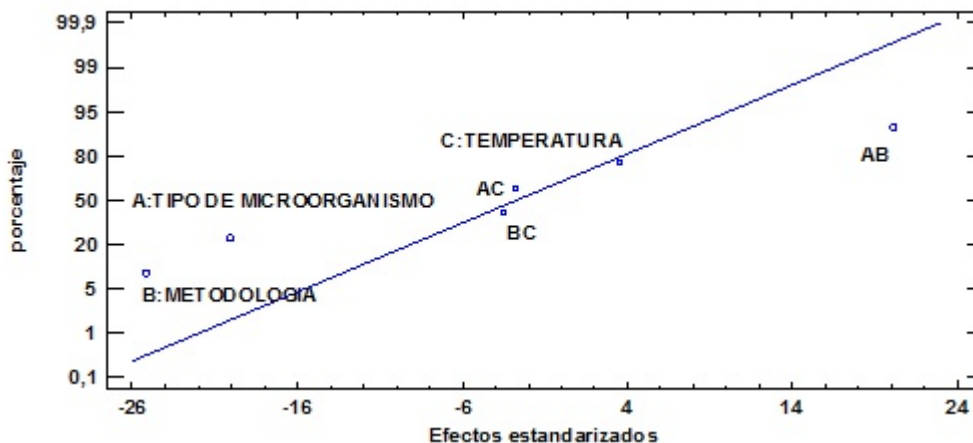
Tabla 8. Efectos estimados del modelo

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	398333,	15852,7	
A:TIPO DE MICROORGANISMO	-636667,	31705,3	1,0
B:METODOLOGIA	-796667,	31705,3	1,0
C:TEMPERATURA	110000,	31705,3	1,0
AB	636667,	31705,3	1,0
AC	-90000,0	31705,3	1,0
BC	-110000,	31705,3	1,0

Fuente: Elaboración de los autores

Al analizar la Gráfica 1 se puede ratificar que todos los factores son significativos para la obtención de la variable de respuesta. Para el caso de la interacción entre factores se consideran relevantes los siguientes: tipo de microorganismo y temperatura; tipo de siembra y temperatura. Lo anterior se puede comprobar en la gráfica de probabilidad normal que se muestra a continuación. (Gráfica 1).

Gráfica 1. Gráfica de probabilidad normal para unidades formadoras



Fuente: Elaboración de los autores

A pesar de que las condiciones utilizadas son diferentes en el tipo de siembra (directa e indirecta) y tipo de microorganismo, la afectación en el resultado de maximización de unidades formadoras no es muy variable.

En este modelo, la interacción de los factores y en sus diferentes niveles tienen que maximizar la detección o aparición de unidades formadoras de colonias presentes en los microorganismos de Bifidobacterium Lactis y Bacillus Coagulans. En la Tabla 9 se describen los factores y niveles que optimizan el diseño.

Tabla 9. Optimización del modelo

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
TIPO DE MICROORGANISMO	-1,0	1,0	-1,0
METODOLOGIA	-1,0	1,0	-1,0
TEMPERATURA	30,0	37,0	37,0

Fuente: Elaboración de los autores

En conclusión, se puede afirmar que el microorganismo con más UFC es el *Bifidobacterium Lactis*, cimentado con siembra indirecta y bajo una temperatura de 37°C.

4.3. Evaluación de la resistencia de microorganismos probióticos a condiciones simuladas de tracto digestivo

Teniendo en cuenta los resultados expuestos anteriormente, se decidió hacer esta prueba bajo dos condiciones:

- Siembra Directa: hace referencia a la muestra procesada sin la fase de pre-enriquecimiento.
- Siembra de Enriquecimiento: hace referencia a la muestra procesada con previa fase de enriquecimiento en caldo MRS a 37°C y 200 rpm por 15 horas.

En la Tabla 10 se observan los resultados del recuento inicial obtenido del Cereal Infantil. Únicamente se observó crecimiento en la muestra sometida a pre-enriquecimiento, alcanzando una concentración celular de $7.7 \cdot 10^3$ UFC/mL.

Tabla 10. Recuento Inicial de bacterias ácido lácticas en cereal infantil

Muestra	Dilución	Conteo de colonias		
Siembra Directa	-1	0	0	0
	-2	0	0	0
	-3	0	0	0
	-4	0	0	0
Siembra Indirecta	-1	77	80	74
	-2	13	16	15
	-3	0	0	0
	-4	0	0	0

Fuente: Elaboración de los autores

Al observar las cajas inoculadas al finalizar el proceso de simulación de tracto digestivo no se observó crecimiento de colonias bajo las dos condiciones analizadas. Este resultado comprueba que el microorganismo presente en la harina si requiere de un proceso previo de

pre-tratamiento para que sea fácilmente liberado al medio, puesto que la muestra que se procesó de manera convencional no presentó crecimiento al momento inicial y la muestra pre-enriquecida sí logró crecimiento, la diferencia en concentración celular puede estar asociado al tiempo de incubación, pues en la prueba de detección anterior se dejó por 22 horas y para este experimento solo fueron 15 horas. Por otra parte, la no detección del microorganismo al finalizar el procedimiento puede estar asociado a la manera como se dispone el microorganismo en la muestra, lo cual corrobora nuevamente que no es de fácil liberación al medio y en el caso de la muestra pre-enriquecida a que la concentración inicial fue muy bajita y en el proceso se pueden perder entre dos y tres escalas logarítmicas. Ver resultados en la Tabla 11.

Tabla 11. Recuento de bacterias ácido lácticas en MP mediante cultivo de enriquecimiento

Prueba	Dilución	Conteo de Colonias		
Detección de Bacterias Ácido Lácticas	-1	0	0	0
	-2	0	0	0
	-3	0	0	0
	-4	0	0	0
	-5	0	0	0
	-1	0	0	0
	-2	0	0	0
	-3	0	0	0
	-4	0	0	0
	-5	0	0	0
	-1	0	0	0
	-2	0	0	0
	-3	0	0	0
	-4	0	0	0
	-5	0	0	0
Mesófilos	-1	0	0	0
	-2	0	0	0
	-3	0	0	0
	-4	0	0	0
	-5	0	0	0
	-1	0	0	0
	-2	0	0	0
	-3	0	0	0
	-4	0	0	0
	-5	0	0	0
	-1	0	0	0
	-2	0	0	0
	-3	0	0	0
	-4	0	0	0
	-5	0	0	0

Fuente: Elaboración de los autores

5. CONCLUSIONES

Para concluir, el microorganismo *Bifidobacterium lactis* requiere la siembra indirecta o de pre-enriquecimiento para su identificación, arrojando un recuento promedio de $1,1 \cdot 10^6$ ufc/g; la temperatura no es un factor determinante, debido a que se mantiene igual en ambas metodologías. Las condiciones de impregnación (preparación de la incubación) del microorganismo podrían afectar la muestra.

Mientras que el probiótico *Bacillus coagulans*, presentó un recuento $1,0 \cdot 10^5$ en la siembra directa, lo que significa que este microorganismo es de fácil identificación, pero no supera las UFC generadas por el *Bifidobacterium* dada la misma temperatura.

Se comprueba que La interacción de los factores *Bifidobacterium lactis*, siembra indirecta y temperatura a 37°C es la mejor opción para maximizar las UFC en los alimentos infantiles. Un aspecto a resaltar en este tipo de estudios, corresponde a la preparación inicial de las muestras, los tiempos de incubación y condiciones de temperatura a mantener.

En la simulación del tracto digestivo en el cereal infantil con el microorganismo probiótico *Bifidobacterium lactis*, muestra que no hay crecimiento de bacterias ácido lácticas con ninguna de las técnicas utilizadas, se tiene resistencia y que los beneficios declarados no llegan al consumidor final.

REFERENCIAS

- [1] C. Reviriego (2015). Los probióticos en la alimentación infantil. Guía infantil. Recuperado de: <https://www.guiainfantil.com/articulos/alimentacion/ninos/los-probioticos-en-la-alimentacion-infantil/>
- [2] FAO. Probióticos en los alimentos propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. (2006). Informe de la consulta de expertos FAO/OMS sobre evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias vivas del ácido láctico. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>
- [3] C. M. Townsend, R. D. Beauchamp, B. M. Evers, K. L. Mattox, J. L. Balibrea & D. C. Sabiston, (2005). Tratado de cirugía: Fundamentos biológicos de la práctica quirúrgica moderna (20a ed.). Capítulo 51, 1312-1393. Madrid: Elsevier España.
- [4] Junta Directiva de la Sociedad de Pediatría de Madrid y Castilla La Mancha. (2007). Manual Práctico de Nutrición en Pediatría. C/ Arboleda. 1 - 28220 Majadahonda, Madrid. Recuperado de: http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/manual_nutricion.pdf
- [5] T. López & C. Torres (2006). Trabajo Practico No.4 Medios de Cultivo. Revista de Microbiología General. Recuperado de: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>.
- [6] L.V. McFarland, C.M. Surawicz & R.N. Greenberg. A Randomized Placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulari* in Combination with Standard Antibiotics for *Clostridium difficile* Disease. JAMA; 1994. No. 271, pp. 1913-1918.
- [7] Organización Mundial de la Salud (2008). La carga mundial de la enfermedad (The global burden of disease). Artículo 371:243–260. Recuperado de: http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/es/
- [8] Organización mundial de la salud (2009). “Europa exige pruebas de las declaraciones de propiedades saludables”, Boletín No. 87. Recuperado de: <http://www.who.int/bulletin/volumes/87/9/09-020909/es/>

-
- [9] D.C. Payne, J. Vinje, P.G. Szilagyi, K.M. Edwards, M.A. Staat & G.A. Weinberg. Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S children. *N Engl J Med*, 2013; No. 368, pp.1121-1130
- [10] Rojas A. (2011). *Conceptos y Práctica de Microbiología general*: Universidad Nacional de Colombia, pág.49 - 51. Palmira, Colombia
- [11] C. M. Townsend, R. D. Beauchamp, B. M. Evers, K. L. Mattox, J. L. Balibrea, & D. C. Sabiston, (2005). *Tratado de cirugía: Fundamentos biológicos de la práctica quirúrgica moderna* (20a ed.). Capítulo 51, 1312-1393. Madrid: Elsevier España.
- [12] K. Yamada, N. Sato-Mito, J. Nagata. Health claim evidence requirements in Japan. *J Nutr*. 2008; No. 138:1192S-8S.