

TESIS DE MAESTRÍA: "CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE CRUDA CON ADICIÓN DIRECTA DE MUCILAGO O EPIDERMIS DE NOPAL (*OPUNTIA FICUS-INDICA*)"



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA: PRODUCCION Y SALUD ANIAMAL

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE CRUDA POST-ADICIÓN DIRECTA DE EPIDERMIS DE NOPAL (*Opuntia ficus-indica*).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN:
PRODUCCION Y SALUD ANIMAL**

PRESENTA

MVZ. JOSÉ LUIS AGUILAR BARRERA

ASESOR

DOTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS ROSA ELENA PÉREZ SÁNCHEZ

Morelia, Michoacán, México., Agosto del 2015.





UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA: PRODUCCION Y SALUD ANIMAL

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE CRUDA POST-ADICIÓN DIRECTA DE EPIDERMIS DE NOPAL (*Opuntia ficus-indica*).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN:
PRODUCCION Y SALUD ANIMAL**

PRESENTA

MVZ. JOSÉ LUIS AGUILAR BARRERA

ASESORES.

DRA. ROSA ELENA PÉREZ SÁNCHEZ

DR. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES

DR. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN

PhD. DANIEL VAL ARREOLA

MC. RUY ORTIZ RODRÍGUEZ

Morelia, Michoacán, México., Agosto del 2015.



AGRADECIMIENTOS

A Dios Agradezco infinitamente por darme salud, y con ello la oportunidad de compartir esta importante etapa de mi vida con todos mis seres queridos.

A Edna Lizbeht, A ti querida esposa por tu apoyo y comprensión, durante el trayecto de este trabajo, por estar siempre a mi lado en todo momento y por la alegría que hoy en día disfrutamos. TE AMO

A mis Hijos. Cristofher, Jade y Luis, que son el motor de mi vida, por estar ahí siempre o. Gracias

A mis Padres. Roberto y María Guadalupe, por el apoyo mostrado y por estar ahí siempre que los he necesitado, sobre todo a ti madre. Gracias.

A mis hermanos. Salvador, Roberto, Rodrigo, Cristina, Lourdes, Elva, Luz Maria. Por estar siempre ahí y apoyarme en toda ocasión.

A mis Amigos. En quienes me apoye y también en ocasiones descuide, sé que siguen ahí con su fiel amistad,

A mis Asesores de tesis. Con especial gratitud al Mc. Ruy Ortiz Rodríguez y la Dra. Rosa Elena Pérez Sánchez quienes han sido un ejemplo y mi guía a seguir y me han tendido una mano amiga durante el desarrollo de esta tesis.

A mis Profesores. Les agradezco de todo corazón sus enseñanzas, sus observaciones, pero sobre todo sus críticas.

A mis asesores de tesis Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores, Dr. Juan José Valdez Alarcón Phd. Daniel Val Arreola por sus sabios consejos y apoyo brindado cuando lo necesite en la realización de esta tesis.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Características de los sistemas de producción bovinos productores de leche a escala familiar en zonas rurales	6
2.2 Producción y calidad de la leche cruda proveniente de sistemas de producción de bovinos a escala familiar	10
2.3 Características generales del nopal (<i>Opuntia</i> sp) y su utilización como forraje para el ganado vacuno productor de Leche	14
2.4 Efecto de la complementación de nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>) a las dietas de bovinos productores de leche sobre calidad de la leche cruda	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
4. HIPOTESIS	29
5. OBJETIVOS GENERALES	30
5.1 Objetivos Específicos	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1 Primera etapa: efecto de la adición directa de la epidermis, mucílago líquido, mucílago deshidratado y pulpa de nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>) a la leche cruda inoculada con <i>Escherichia coli</i> más antibióticos sobre el número (\log_{10})	31

de UFC/mL para Bacterias Mesófilas Aerobias y Coliformes Totales.

6.1.1 Métodos	31
6.1.1.1 Inoculación a la leche cruda con la cepa <i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue plsd1.4 y antibióticos (tetraciclina y ampicilina)	31
6.1.1.2 Extracción del Mucílago	32
6.1.1.3 Extracción de la epidermis del cladodio de nopal	34
6.1.1.4 Extracción de la pulpa del cladodio de nopal	34
6.1.1.5 Obtención de leche cruda y formación de grupos	35
6.1.1.6 Microbiológico de las Muestra	36
6.1.1.7 Diseño estadístico	37
6.2 Segunda etapa: efecto de la epidermis, mucílago líquido, mucílago deshidratado y pulpa de nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> bajo la metodología del antibiograma.	38
6.2.1 Métodos	38
6.2.1.1 Extracción del Mucílago, epidermis y pulpa para la prueba de antibiograma.	38
6.2.1.2 Crecimiento del <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	38
6.2.1.3 La inoculación de las placas	39
6.2.1.4 Aplicación de los discos a placas de agar inoculado	40
6.2.2 Diseño estadístico	40
6.3 Tercera Etapa: efecto de la cera cuticular del nopal sobre <i>Staphylococcus aureus</i> bajo la metodología del antibiograma.	40
6.3.1 Métodos	41

6.3.1.1 Obtención de la cera cuticular del nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	
6.3.1.2 Crecimiento e inoculación del <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213) en placas y aplicación de los discos para el antibiograma	41
6.3.2 Diseño Estadístico	41
7. RESULTADOS	42
7.1 Resultados de la primera etapa de la investigación: Efecto de la adición directa de las PN a la leche cruda sobre BMA y CT	42
7.2 Resultados de la segunda etapa: Determinación del efecto de las partes del nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>) sobre el crecimiento del <i>Staphylococcus aureus</i> (cepa ATCC 29213) a través de la metodología del antibiograma	46
7.3 Resultados de la tercera etapa: efecto de la cera cuticular de <i>Opuntia ficus-indica</i> sobre el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> bajo la metodología del antibiograma	48
8. DISCUSION	50
9. CONCLUSION	54
10. BIBLIOGRAFIA	56

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructuras químicas de los azúcares del mucílago.	19
Tabla 1. Clasificación Taxonómica del nopal.	15
Tabla 2. Conformación de tratamientos de acuerdo al inóculo, antibiótico y partes de nopal	37
Tabla 3. Medias de mínimos cuadrados para UFC/mL de bacterias mesófilas aerobias en leche de acuerdo al tratamiento con y sin inóculo y antibiótico y partes de nopal.	43
Tabla 4. Medias de mínimos cuadrados para UFC/mL de Coliformes Totales en leche de acuerdo al tratamiento y a la inclusión o no de inóculo y antibióticos.	43
Tabla 5. Medias de mínimos cuadrados de halo de inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> (cepa ATCC 29213) e interpretación del antibiograma de acuerdo al tratamiento.	47
Tabla 6. Medias de mínimos cuadrados de halo de inhibición e interpretación para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 de acuerdo al tratamiento.	49

SUMMARY

Safety is one aspect that restricts the marketing of raw milk and its by-products obtained in family systems, because of the risk that may lead to public health. It has been documented that milk obtained from small producers, which does not carry a strict sanitary control, not only is sold in local markets, but also is used for household consumption or for the manufacture of fresh artisan cheeses same as intended for sale or consumption. In this situation, our preliminary studies establish that working group, use of nopal (*Opuntia ficus-indica*) to supplement the diet of dairy cows, specifically the epidermis of the nopal, has positive effects on the bacteriological quality of the raw milk and artisanal cheese. Therefore, the objective of this research was to investigate if the direct addition of the epidermis (Ep) of *Opuntia ficus-indica* on raw milk reduces the number of CFU/ml of aerobic mesophilic (BMA) and total coliforms (CT) in compared with liquid mucilage (ML), dried mucilage (MD) and pulp (Pa) of nopal. Using for this, the assessment of post direct addition of Ep, ML, and MD Pa *Opuntia ficus-indica* bacterial load of BMA and CT raw milk inoculated with *Escherichia coli* XL-1 Blue plsd1.4 and added with antibiotics (ampicillin + tetracycline). To reinforce the information a second stage of research, where determined, the antimicrobial effect of Ep, ML, MD, Pa *Opuntia ficus-indica* on *Staphylococcus aureus* 29213 under the inhibition in disk methodology. Finally, a third stage where evaluate the effect of cuticular wax (Cc) Ep of nopal on the halo of growth inhibition of *Staphylococcus aureus* 29213 was assessed designed. The results obtained by research stage were: first stage, to the number (log₁₀) of CFU / mL for BMA in raw milk was found that raw milk without addition of FN without inoculum without antibiotics (control) containing 7.3 log₁₀ CFU/mL of BMA. Adding Ep showed better performance ($P < 0.05$) in reducing CFU/mL of BMA in comparison to the control. Regarding the rest of the FN analyzed it was found that (ML, MD and Pa) showed lower values ($P < 0.05$) to the control treatment, but equal ($P > 0.05$) treatments Ep; however, treatments Ep showed trend towards greater reduction (log₁₀) of CFU/mL of BMA in raw milk. In relation to CT in raw milk, it was determined that Ep treatment without antibiotics reduced inoculum without CT (5.4 log₁₀ CFU/mL) compared to the control: 6.8 log₁₀; and even it was lower ($P < 0.05$) to the other PN (ML, MD and P) analyzed. In the case of the results of the second stage it was found that Ep showed better behavior ($P < 0.05$) to inhibit the growth of *S. aureus* strain at 24 h post-incubation (inhibition zone equal to 0.75 mm), This compared with other PN evaluated: average inhibition halos of 50 mm or less. Finally, the results of the disks impregnated with the solution Cc showed higher growth inhibition of *S. aureus* ($P < 0.05$) compared to Ep: 2.00 and 0.75 mm zone of inhibition, respectively. These results might suggest that the bacteriostatic action of the epidermis is due to the proportion of the wax contained in fraction (1.0% based on 100 mL of distilled water or raw milk) added directly to the raw milk.

RESUMEN

La inocuidad es uno de los aspectos que limita la comercialización de la leche cruda y sus subproductos obtenidos en los sistemas familiares, debido al riesgo que puede ocasionar a la salud pública. Se ha documentado que, la leche que obtienen los pequeños productores, que no lleva un control sanitario estricto, no solo es comercializada en los mercados locales, sino además, se utiliza para consumo familiar o para la fabricación de quesos fresco artesanal, mismo que se destina a la venta o para autoconsumo. Ante esta situación, estudios preliminares de nuestro grupo de trabajo establecen que, el uso de nopal (*Opuntia ficus-indica*) como complemento de la dieta de vacas productoras de leche, específicamente la epidermis del nopal, tiene efectos positivos sobre la calidad bacteriológica de la leche cruda y el queso fresco artesanal. Por ello, el objetivo de la presente investigación fue investigar si la adición directa de la epidermis (Ep) de *O. ficus-indica* a la leche cruda reduce el número de UFC/ml de mesófilas aerobias (BMA) y Coliformes totales (CT) en comparación con el mucílago líquido (ML), mucílago deshidratado (MD) y la pulpa (Pa) de nopal. Utilizando para ello, la evaluación de la carga bacteriana de BMA y CT posterior a la adición directa de Ep, ML, MD y Pa de *O. ficus-indica* a la leche cruda inoculada con *Escherichia coli* XL-1 Blue plsd1.4 y adicionada con antibióticos (tetraciclina + ampicilina). Para reforzar la información se estableció una segunda etapa de investigación, en donde se determinó, el efecto antimicrobiano de las fracciones Ep, ML, MD, Pa de *O. ficus-indica* sobre *Staphylococcus aureus* 29213 bajo la metodología de inhibición en disco. Finalmente, se diseñó una tercera etapa, en donde se evaluó el efecto la cera cuticular (Cc) de Ep de nopal sobre el halo de la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* 29213. Los resultados obtenidos por etapa de investigación fueron: primera etapa, para el caso del número (Log_{10}) de UFC/mL para BMA en leche cruda, se encontró que, la leche cruda sin adición de FN, sin inóculo y sin antibióticos (testigo) contenía 7.3 Log_{10} UFC/mL de BMA. La adición de Ep mostró mejor comportamiento ($P < 0.05$) en la reducción de UFC/mL de BMA en comparación con el testigo. En lo referente al resto de las FN analizadas se encontró que (ML, MD y Pa) mostraron valores menores ($P < 0.05$) al tratamiento testigo, pero iguales ($P > 0.05$) a los tratamientos con Ep; sin embargo, los tratamientos con Ep mostraron tendencia hacia una mayor reducción (Log_{10}) de UFC/mL de BMA en leche cruda. En relación a CT en leche cruda, se pudo determinar que, el tratamiento con Ep, sin inóculo y sin antibióticos redujo CT (5.4 Log_{10} UFC/mL) en comparación con el testigo: $6.8 \pm 0.25 \text{ Log}_{10}$; e incluso, fue menor ($P < 0.05$) al resto de PN (ML, MD y P) analizadas. Para el caso de los resultados de la segunda etapa se encontró que, Ep mostró mejor comportamiento ($p < 0.05$) para inhibir el crecimiento de la cepa de *S. aureus* a 24 h post-incubación (halo de inhibición igual a 0.75 mm), ello en comparación con el resto de PN evaluadas: halos de inhibición promedio de 50 mm o menos. Finalmente, los resultados de los discos impregnados con la solución Cc mostraron un mayor inhibición del crecimiento de *S. aureus* ($P < 0.05$) en comparación con Ep: 2.00 y 0.75 mm de halo de inhibición, respectivamente. Estos resultados podrían sugerir, que la acción bacteriostática de la epidermis se deba a la parte proporcional de la cera contenida en la fracción (1.0% en base 100 mL de agua destilada o en leche cruda) adicionada directamente a la leche cruda.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas fundamentales que impiden el desarrollo de los sistemas de producción de bovinos productores de leche, es la escasez de forraje de calidad (Ortega *et al.*, 2010). Por ello, las dietas del ganado criado bajo pastoreo están sujetas a frecuentes fluctuaciones en cuanto a calidad y cantidad del forraje consumido, lo que provoca comportamiento productivo deficiente de los hatos explotados en zonas rurales donde los periodos de estiaje son más prolongados (Medina *et al.*, 2006).

Bajo el contexto agroecológico de Michoacán, sobre todo en las zonas áridas y semiáridas, las explotaciones ganaderas extensivas contribuyen notablemente con el deterioro acelerado del ecosistema: erosión del suelo, escasez de agua y desertificación. Sin embargo, la ganadería es una de las tres actividades más importantes en el estado, por lo cual se requiere mejorar la producción y los ingresos de los productores; sin dejar de lado, la restauración de la fertilidad de los suelos, la protección del agua y los trópicos de la entidad (Rodríguez, 2008).

Ante este escenario, algunos productores han intentado solucionar el problema de la alimentación de su ganado mediante la utilización de forrajes autóctonos, como las especies del género *Opuntia* sp (Reveles *et al.*, 2010). Sin embargo, los productores al utilizar el nopal como forraje, en época de estiaje, lo hacen debido a la falta de insumos básicos de la dieta de su ganado: esquilmos y/o pasto nativo (Flores-Valdez, 2001). En investigaciones sobre la complementación de dietas de ganado bovino con nopal forrajero (*O. ficus-indica*), se ha establecido que, el nopal, como complemento de las dietas,

incrementa la producción de leche, mejora la calidad de la misma y aumenta la vida de almacén de subproductos lácteos (García *et al.* 2005).

La propiedad del nopal de incrementar la calidad de la leche cruda y sus subproductos (Ortiz *et al.*, 2013), al incorporarlo a las dietas del ganado lechero, es trascendental; debido a que, la inocuidad de los alimentos es uno de los conceptos clave en la salud pública, aspecto que limita la comercialización de la leche cruda y sus subproductos obtenidos en los sistemas familiares. Sin embargo, la leche que obtienen los pequeños productores, que no recibe un tratamiento térmico ni tiene control sanitaria estricta, se utiliza para consumo familiar o para la fabricación de queso fresco artesanal, mismo que se destina a la venta o para autoconsumo, conformando una práctica sin controles sanitarios (Garcés *et al.*, 2005). Estudios preliminares establecen que, el uso de nopal (*O. ficus-indica*) como complemento de la dieta de vacas Holstein tiene efectos positivos sobre la calidad bacteriológica de la leche cruda y el queso fresco artesanal (Ortiz *et al.*, 2013).

Ortiz-Rodríguez *et al.* (2012) determinaron que, la leche cruda derivada de vacas que consumieron una dieta complementada con 12 kg de nopal contenía 1.6 (log₁₀) UFC/mL para mesofilas aerobias (BMA) y 2.2 (log₁₀) UFC/mL de coliformes totales (CT); ambos valores inferiores a 2.6 (log₁₀) UFC/mL para BMA y 2.4 (log₁₀) UFC/mL para CT encontrados en leche cruda proveniente de vacas que no consumieron nopal, como complemento de su dieta. El mismo efecto se encontró en el queso fresco artesanal, derivado de leche cruda obtenida de vacas alimentadas con nopal, como complemento de la dieta. Estos resultados, sugieren que, el nopal posee cualidades bacteriostáticas. Ortiz *et al.* (2013), intentaron comprobar si el efecto del nopal sobre la calidad de la leche cruda y el

queso fresco artesanal era producto de una acción propia o resultado indirecto del proceso de digestión, absorción de los componentes del nopal y la posible generación de algún metabolito final con características bacteriostáticas. Por ello, estos investigadores plantearon una investigación exploratoria para determinar el efecto de la adición directa, de mucílago y epidermis de nopal, así como, nopal molido, a la leche cruda, sobre la calidad microbiológica de la misma. Se encontró que, la adición directa de epidermis de nopal o nopal molido a la leche cruda disminuyó ($P < 0.05$) las UFC/mL de BMA y CT, ello en comparación con las UFC/mL, de dichas bacterias, encontradas en la leche cruda sin tratamiento de los componentes de nopal. De lo anteriormente escrito, se desprende la importancia de la presente investigación, puesto que se requiere validar los resultados encontrados en la investigación exploratoria sobre el efecto de la adición directa de las fracciones del nopal a la leche cruda sobre la calidad de la misma.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características de los sistemas de producción bovinos productores de leche a escala familiar en zonas rurales

El sistema de producción de leche a escala familiar se encuentra presente en la mayor parte del territorio nacional. En este sistema, la explotación del ganado está condicionada a superficies pequeñas de terreno, en donde se ubican, por lo general, las viviendas de los productores y sus familias, por lo que también se le denomina "sistema de traspatio" (Moreno-García *et al.*, 2012). Las unidades de producción pueden ser de tipo estabulado o semi-estabulado, de acuerdo con las condiciones del campo de cultivo (SAGARPA, 2000; Molina, 2006). El nivel tecnológico en el sistema familiar puede considerarse como bajo; puesto que, las instalaciones y equipo son rudimentarios y no proporcionan confort a los animales. Además, los productores no realizan prácticas reproductivas, de medicina preventiva o mejoramiento genético, carecen de registros para el control y manipulación de los eventos reproductivos y productivos (SAGARPA 2004).

Las unidades de producción son manejadas en promedio por familias de cinco miembros (Jiménez *et al.*, 2008). El genotipo de los animales del sistema es generalmente híbrido, principalmente de la raza Holstein y en menor proporción Pardo Suizo Americano y sus cruas (SAGARPA, 2000; Molina, 2006). La alimentación en el sistema familiar se basa en el pastoreo o en el suministro de forrajes y esquilmos provenientes de los cultivos que produce el mismo productor, en su unidad de producción agrícola (SAGARPA 2004;

Molina, 2006). Jiménez *et al.* (2008) encontró que, la alimentación de la vacas en producción varía con la época del año y con el sistema de confinamiento; el 63% mantienen su ganado semi-estabulado y el resto en estabulación total. En relación a la época de lluvias (mayo - septiembre), la alimentación se basa en alimento balanceado, maíz (*Zea mays*), salvado, rastrojo de maíz o sorgo (*Sorghum vulgare*), complementado con el pastoreo de gramas nativas, forrajes verdes como bállico anual (*rye grass*) y trébol (*Trifolium spp*). Mientras que en la época de estiaje (octubre-abril), el alimento se basa en esquilmos agrícolas (rastrojo de maíz o sorgo) y pacas de avena (*Avena sativa*); esto en el mejor de los casos y de acuerdo a los ingresos del productor (Molina, 2006).

Los hatos en el sistema familiar están conformados de 2 a 20 vacas, los cuales presentan de 1 a 12 vacas en producción (Sánchez y Sánchez 2005) y el rendimiento promedio/vaca/hato oscilan en 9 L; producción que, se acerca al promedio nacional. Este tipo de sistemas contribuyó en el año 2000 con el 30% de la producción total de leche y estaba conformado por solo el 23% de los vientres inventariados a nivel nacional (García *et al.*, 2007). Aunado a ello, en los últimos años se ha observado una tendencia en la disminución de la producción lechera familiar en el país, cuyas causas incluyen: problemas en la tenencia de la tierra, políticas de fomento hacia el productor, inseguridad, altos costos de producción, baja calidad de la leche (García *et al.*, 2005) y poca integración a las cadenas productivas (Espinoza, *et al.*, 2002). El conjunto de estos factores, asociados a las tendencias de concentración y centralización de la producción intensiva a gran escala, limitan la participación de la producción familiar en los sectores comerciales, por lo que en el mejor de los casos quedan relegados al comercio local donde desarrollan la actividad y encuentran un mercado para su producto (Moreno-García, *et al.*, 2012).

Aun y cuando la tendencia indica una menor participación de los sistemas familiares en la producción de leche, en el estado de Michoacán, se ha establecido que existe un total de 62,545 familias que se dedican a la ganadería, aprovechando 2'451,855 hectáreas, lo que equivale a 2.9 veces la superficie ocupada por la agricultura en el estado (Sánchez y Sánchez, 2005). No solo se ha cuantificado a la ganadería del estado, también se ha analizado la capacidad de los ganaderos para adaptar sus sistemas de producción a la gran diversidad fisiográfica y climática del estado; por ejemplo, existen zonas donde es nula la vocación agrícola para el éxito de la ganadería, cuyo finalidad zootécnica es la producción de leche, como sería el caso de la región Tierra Caliente del estado de Michoacán, donde prevalecen los sistemas de producción de doble propósito (Moreno-García *et al.*, 2012).

Caso contrario es la región del Bajío michoacano, en donde las condiciones climáticas han permitido una mayor expansión de la lechería "familiar". De aquí que la eficiencia de la ganadería no solo radica en su número y adaptabilidad a las diversas zonas geográficas, sino también por ser la actividad que genera más empleos permanentes en el sector agropecuario del estado de Michoacán, pues genera alrededor del 8.6% de empleos fijos, lo que equivale a la población económicamente activa a nivel estatal y 37.3% de la población económicamente activa del sector primario del estado (INEGI, 2004).

Todas las características referidas, en los párrafos anteriores, determinan que los sistemas de lechería familiar respondan, de forma general, a la estructura socioeconómica de las zonas rurales del país. Por ello, aprovechan los recursos de familias campesinas: mano de obra de tipo familiar, esquilmos agrícolas producto de sus parcelas, uso de pastos nativos y en menor medida, uso de insumos comerciales para la alimentación del ganado; así como poca o nula inversión en infraestructura (Moreno-García *et al.*, 2013). No

obstante, en lo referente a la alimentación del ganado, se ha reportado que existe una proporción baja de sistemas que cuentan con pastos mejorados, como parte de las estrategias de alimentación del ganado; pero ello ocurre tan solo en el 7% de las unidades productivas a nivel familiar (Sánchez y Sánchez 2005).

En las regiones rurales de Michoacán, específicamente en las zonas áridas y semiáridas, los sistemas de producción bovina se han caracterizado por ser de tipo extensivo y con poca o nula tecnificación (Macedo *et al.*, 2006). Por lo que, uno de los problemas fundamentales que impiden el desarrollo de los sistemas de producción de bovinos productores de leche en este tipo de zonas, es la escasez de forraje de calidad (Medina *et al.*, 2006). Debido a que, estas zonas agroecológicas están definidas por la precipitación pluvial, misma que determinan la oferta de recursos forrajeros. Y como se sabe, esta oferta disminuye en la época de estiaje y se exagera cuando el estiaje es más prolongado, aspecto que provoca un comportamiento productivo deficiente de los hatos explotados en este tipo de zonas. Puesto que, el ganado criado bajo pastoreo está sujeto a frecuentes fluctuaciones en cuanto a calidad y cantidad del forraje consumido (Gutiérrez *et al.*, 2008). Fluctuaciones que pueden afectar la rentabilidad de los sistemas de producción de bovinos productores de leche (Moreno-García *et al.*, 2013).

Bajo el contexto ambiental de Michoacán, las explotaciones ganaderas extensivas contribuyen notablemente con el deterioro acelerado del ecosistema, erosión del suelo, escasez de agua y desertificación. Sin embargo, la ganadería es una de las tres actividades más importantes en el estado, por lo cual se requiere mejorar la producción y los ingresos de los productores; sin dejar de lado la restauración de la fertilidad de los suelos, la protección del agua y los trópicos de la entidad (Rodríguez, 2008).

2.2 Producción y calidad de la leche cruda proveniente de los sistemas a escala familiar.

García et al. (2005) establecieron que la infraestructura tecnológica y disponibilidad de alimento en diferentes épocas del año limita la participación de la producción de los sistemas familiares en los sectores comerciales, por lo que en el mejor de los casos quedan relegados al comercio local donde desarrollan la actividad y encuentran un mercado para su producto. Sánchez y Sánchez. (2005) determinaron que, la productividad de la lechería familiar está supeditada por: (a) su conformación socioeconómica, determinada por la estructura de las zonas rurales del país; (b) uso de recursos como, mano de obra familiar, cultivos forrajeros y residuos de cosecha producidos en sus parcelas, con una reducida inversión en insumos; (c) poca inversión en infraestructura y, (d) el manejo del hato se da en condiciones de estabulación o semiestabulación, en instalaciones cercanas a la vivienda de la familia.

En general, los sistemas familiares de bovinos productores de leche poseen un rendimiento promedio que oscila alrededor de los 9 kg de leche vaca⁻¹ d⁻¹. El resultado de estas características se refleja en la baja eficiencia de este tipo de sistema, el cual oscila entre \$1.02 y \$6.87 USD de márgenes de utilidad, lo que equivaldría a una ganancia diaria

por jornalero de \$1.29 hasta \$8.52 USD¹. Este monto les limita a cubrir las necesidades básicas de las familias (Moreno-García *et al.*, 2012)

Por otra parte, la leche cruda que oferta la lechería familiar (caliente o fría) es a través de canales directos al consumidor, al autoconsumo o queserías artesanales; leche y subproductos obtenidos con amplia variación en el nivel de producción, manejo de la ordeña y prácticas sanitarias (Cervantes *et al.*, 2001). Del mismo modo, el INEGI (1999) establece que, la elaboración de productos artesanales derivados de la leche cruda sigue siendo una costumbre en México, tanto en comunidades rurales como en áreas periurbanas de las ciudades. Debido esencialmente, a que esta actividad (fabricación de productos derivados de la leche cruda) es un complemento del ingreso económico familiar al ofertar: quesos, yogures, natillas, nata, dulces, entre otros más. Aunado ello, también es una fuente de ahorro, derivado del autoconsumo tanto de leche cruda como de subproductos de la misma.

Jensen (1995), determinó que la calidad de la leche cruda puede deteriorarse debido a un manejo inadecuado de los utensilios de ordeño, transporte o adulteración (grasas, sales, agua, entre otros), aumentando la carga bacteriana y propiciando propiedades indeseables de acidez, rancidez o agriado. Es un hecho que la leche al interior de la cisterna (órgano de depósito de almacenamiento de leche de la vaca), es estéril. Sin embargo, una vez realizado el ordeño, ésta es susceptible de contaminarse con altas cargas bacterianas -parte de estas pueden ser patógenas- provenientes de la tierra y estiércol presente en las ubres de las vacas (Magariños., 2001).

¹ El dólar se cotiza a \$12.00 en el 2012. <http://www.banxico.org.mx/dyn/portal-mercado-cambiarior/index.html>

En relación a los aspectos de calidad de la leche, estos cubren un cierto número de variables, como: su composición físico-químico, es decir, el contenido de proteína, grasa, acidez, densidad, sólidos no grasos, el potencial genético de la vaca y la alimentación. Otra variable que también determina la calidad de la leche cruda es su carga bacteriana o cuentas bacterianas (Minakowski, 1993; Lach y Podkówka, 2000). Los conteos bacterianos altos, en leche cruda, pueden afectar su calidad y aceptación por el consumidor e incluso, en la leche pasteurizada, descremada en polvo o los subproductos (crema y queso) los organismos no patógenos pueden alterar la calidad de estos (Barbano *et al.*, 2006, Jayarao *et al.*, 2006).

La importancia de la calidad de la leche cruda y sus subproductos se centra en la inocuidad y seguridad alimentaria. Sin embargo, los pequeños productores de ganado vacuno, quienes obtienen leche para la venta, el autoconsumo y/o la fabricación de quesos frescos artesanales, conforman un mercado desprotegido, informal y prácticamente sin controles sanitarios (Garcés *et al.*, 2005). Al respecto, en el Noreste del estado de Michoacán, se ha encontrado que la leche cruda de los sistemas productores de bovinos lecheros contenía entre 6.7 y 7.9 (\log_{10}) unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL) de BMA y de 2.3 a 3.5 (\log_{10}) UFC/mL de CT (Carrión *et al.*, 2007). Mientras que en el Municipio de Sahuayo, Michoacán, los estudios determinaron que la leche cruda contenía de 8.0 a 9.0 (\log_{10}) UFC/mL de BMA y de 5.7 a 8.0 (\log_{10}) UFC/mL de CT (Flores *et al.*, 2009). Valores superiores a los estándares que marca la norma oficial mexicana; 6 y 2 (\log_{10}) UFC/mL para BMA y CT, respectivamente, para que la leche cruda se considere apta para el consumo humano (NMX-F-700-COFOCALEC, 2004).

Estudios, relacionados con la salud de la ubre de vacas lecheras, determinaron que en la región de Jiquilpan, Michoacán, el 80% de las explotaciones bovinas presentaron mastitis, cuyo principal patógeno fue *Staphylococcus aureus* (Caraveo *et al.*, 2007). En Álvaro Obregón, Michoacán este mismo patógeno se aisló en el 94% de las explotaciones bovinas afectadas por mastitis en el (Beiza *et al.*, 2007). De manera general, se ha establecido que en el estado de Michoacán, la mastitis es ocasionada en un 65% por *Staphylococcus aureus* (Carrión *et al.*, 2009).

Así mismo, la mastitis es uno de los principales problemas sanitarios ya que afecta la calidad y producción de la leche, además causa un incremento en los gastos por tratamiento (Orrego *et al.*, 2003). Además, para aspectos de inocuidad de la leche cruda, la mastitis genera leche de mala calidad y un decremento hasta de un 36.6% en el rendimiento del queso, más el riesgo a la salud del consumidor (Beiza *et al.*, 2007).

Farkye (2002) determinó que, la presencia de microorganismos patógenos en queso no solo depende de la calidad de la leche cruda, sino de otros factores como: calidad del tratamiento térmico de la leche, limpieza del material usado para quesería, manejo de la cuajada durante el procesamiento y de la temperatura de almacenamiento, entre otros factores más. Sin embargo, en la calidad del queso fresco artesanal, esta se asocia por lo general, a la salud de la ubre de las vacas (Delgado *et al.*, 2003), a los altos niveles de humedad que presentan los quesos frescos, mismos que provocan el desarrollo de microorganismos patógenos (*Salmonella* y *Escherichia coli* serotipo O157:H7) causantes de infecciones e intoxicaciones alimentarias (Ceron, 2008); puesto que este tipo de queso se elabora a partir de leche cruda sin pasteurizar (Delgado *et al.*, 2003).

2.3 Características generales del nopal (*Opuntia* spp) y su utilización como forraje para el ganado vacuno productor de leche

El nopal (*Opuntia* spp) tiene un origen e historia relacionados con las antiguas civilizaciones mesoamericanas, en particular con la cultura azteca. Existen evidencias arqueológicas que permiten afirmar que las poblaciones indígenas asentadas en las zonas semiáridas de Mesoamérica fueron las que iniciaron su cultivo formal (Sáenz *et al.*, 2007).

Opuntia spp ha desempeñado un papel importante en el desarrollo histórico de las culturas del centro de México, de los grupos chichimecas del centro y el norte del país, así como en algunas culturas del sureste como la mixteca y la zapoteca, en Oaxaca (Granados y Castañeda, 2000). Las culturas prehispánicas lo nombraron *nopalli* y *nochtli* y, lo usaron en la alimentación, medicina, religión, magia, y política; ya que el escudo de la gran Tenochtitlán ostentaba un nopal, así como el Escudo Nacional actual (Paredes *et al.*, 2006).

Los nopales son originarios de América tropical y subtropical, sin embargo, en la actualidad se encuentran en una gran variedad de condiciones agroclimáticas, en forma silvestre o cultivada, en todo el continente americano. Además, se han difundido a África, Asia, Europa y Oceanía donde también se cultivan o se encuentran en forma silvestre (Sáenz *et al.*, 2007). La planta se distribuye principalmente en América, en donde México, es catalogado como el país con mayor abundancia de especies (Granados y Castañeda, 2000).

El nopal es una verdura, que pertenece a la familia de las cactáceas (Tabla 1) y al género *Opuntia* que se divide en los subgéneros: a) *Cynlindropuntia*, b) *Grusonia*, c) *Corynopuntia*, d) *Opuntia* y e) *Stenopuntia* que se clasifican en series: contiene 22 series y 377 especies, de las cuales 104 se encuentran en forma silvestre en México y de éstas, 60 son especies mexicanas (Granados y Castañeda, 2000); sin embargo, hay solo 10 o 12 especies hasta ahora utilizadas por el hombre, ya sea como alimento, forraje o producto industrial, entre éstas se encuentran, como especies para alimento: *O. ficus-indica*, *O. amyclaea*, *O. xocconostle*, *O. megacantha* y *O. streptacantha*. Y como especies silvestres: *Opuntia hyptiacantha*, *O. leucotricha* y *O. robusta*. De todas estas especies la común y más cultivada en distintas partes del mundo es *Opuntia ficus-indica* (Ruiz y Guerrero, 2009).

Tabla 1. Clasificación Taxonómica del nopal.

Superreino o División	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Viridiplantae</i>
Phylum	<i>Streptophyta</i>
Subphylum	<i>Embryophyta</i>
División	<i>Mesangiospermae</i>
Clase	<i>Eudicotyledonea</i>
Subclase	<i>Pentapetalae</i>
Orden	<i>Caryophyllales</i>
Familia	<i>Cactaceae</i>
Subfamilia	<i>Opuntioideae</i>
Género	<i>Opuntia</i>
Especie	<i>Opuntia ficus-indica</i>

Fuente: National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>)

Los nopales son plantas arbustivas, rastreras o erectas que pueden alcanzar de 3.5 a 5 m de altura. Es densamente ramificado, rico en raíces finas y absorbentes y superficiales en zonas áridas de escasa pluviometría. Los tallos o cladodios suculentos y articulados, comúnmente llamados pencas, presentan forma de raqueta ovoide o alargada de 60-70 cm

de longitud, cuando miden 10-12 cm son tiernos y se consumen como verdura (Rios y Quintana, 2004).

En *Opuntia*, en las dos caras del cladodio, se presentan las yemas, llamadas areolas que presentan en su cavidad espinas; aguates y espinas grandes. Las flores son sésiles, hermafroditas y solitarias, se desarrollan en el borde superior de las pencas, pueden ser de color rojo, amarillo y blanco (Guzmán *et al.*, 2003). El fruto es una falsa baya con ovario ínfero simple y carnoso. La forma puede ser ovoide, redonda, elíptica, y oblongas, con los extremos aplanados, cóncavos o convexos. El color puede ser rojo, anaranjado, púrpura, amarillos y verdes. La epidermis es muy parecida a la del cladodio, incluso con areolas y abundantes aguates y espinas. Las características de las diferentes especies de nopal son variables, se diferencian en la ausencia o presencia de espinas, la forma de los cladodios, en el tamaño y color de los frutos, y otras características botánicas (Sáenz *et al.*, 2007).

O. ficus-indica tiene un mínimo de espinas, es un vegetal arborescente que puede llegar a medir de 3 a 5 m de alto, su tronco es leñoso y mide de 20 a 50 cm de diámetro. Sus pencas o cladodios miden de 30 a 60 cm de largo x 20 a 40 cm de ancho y de 2 a 3 cm. de grosor. Sus ramas están formadas por pencas de color verde opaco con areolas que contienen espinas y produce flores de 7 a 10 cm de largo, su fruto es oval de 5 a 10 cm. de largo x 4 a 8 cm. de diámetro y su color puede ser amarillo, anaranjado, rojo o púrpúreo con abundante pulpa carnosa y dulce (Rodríguez *et al.*, 2010).

En la composición química del nopal en fresco y en polvo se destaca el alto contenido promedio en agua (91.80%), siguiéndole el de carbohidratos (5.50%) y el de cenizas (1.58%) (Granados y Castañeda, 2000; Reza *et al.*, 2005). Los mayores

componentes minerales en el nopal son calcio (93 mg) y hierro (1.60 mg). El nopal también contiene algunos aminoácidos como arginina, histidina, lisina, metionina y treonina. Pero además, posee un elevado porcentaje de fibra dietética (40%) cuando su presentación es en polvo (Abraján, 2008). El nopal contiene también otros minerales como aluminio, magnesio, potasio, sílice, sodio y manganeso, además de vitamina A, B₁, B₂, y C (Reza *et al.*, 2005).

El nopal (*O. ficus-indica*) es una planta muy atractiva como alimento para el ganado, particularmente por su alta eficiencia al utilizar luz solar en el proceso fotosintético y convertir agua en biomasa, y por su contenido de energía digestible (Ruiz *et al.* 2008; Medina *et al.* 2006). Este es útil no sólo porque sobrevive a las sequías, sino también porque es más eficiente que muchas gramíneas o pastos forrajeros de hoja ancha durante la época estiaje. La importancia forrajera del nopal para la alimentación del ganado radica en que permanece verde durante los períodos de sequía o invierno, este (Santos *et al.*, 2010).

O. ficus-indica se considera como un forraje succulento, rico en agua y mucílago, con niveles significativos de calcio (1.8 a 2.5 %), potasio (1.5 %) y magnesio (0.7 a 1.1 %) (Wanderley, 2001). Además, presenta hasta un 70% de carbohidratos no estructurales – CNE- (fructooligosacáridos, inulina, mucilagos, pectinas y almidones) y una aceptable digestibilidad (65 a 80%) de materia seca (MS) y materia orgánica (MO): 78 a 81% (Bezerra *et al.*, 2002; Torres, 2010). No obstante, posee un bajo contenido de MS (10 a 14 %), fibra detergente neutra (26,8%) y proteína cruda (PC): 4.0 a 6.0%) (Vázquez *et al.*, 2007).

López (2010), estableció que el valor de la proteína del nopal (4.0 – 6.0% de PC) solo permite utilizarlo como complemento de la dieta para rumiantes domésticos con el fin de mantener su productividad durante la época de estiaje. No obstante, investigaciones referentes a la utilización del nopal como complemento de la dieta de vacas lecheras sugieren que esta planta es una alternativa para incrementar la producción de leche en época de estiaje, además, mejora la calidad de la misma (Ortiz *et al.*, 2012)

García *et al.*, (2013), probaron tres niveles de inclusión de *O. ficus-indica* (10, 20 y 30 kg d⁻¹) a las dietas de vacas Holstein y reportan que al complementar la dieta con 10 y 20 kg d⁻¹ de nopal vaca⁻¹ aumento ($p < 0.05$) la producción láctea a 13.394 y 13.103 kg d⁻¹ de leche, respectivamente, siendo ambos tratamientos diferentes ($p < 0.05$) a la adición de 30 kg d⁻¹ de nopal vaca⁻¹, cuya producción fue de 12.294 kg de leche d⁻¹. Por lo tanto, concluyen que la inclusión de 10 y 20 kg d⁻¹ de nopal a la dieta de las vacas fueron los nivel de complementación que mejor desempeño presentaron sobre la producción láctea.

Así mismo, se demostró que al administrar 12 kg d⁻¹ de nopal vaca⁻¹ como complemento de dietas para bovinos productores de leche, la producción láctea y sus derivados (queso fresco) son de mayor calidad organoléptica: consistencia, olor, textura y rendimiento. Además, la vida de almacenamiento de los derivados de la leche se incremento, debido a que los efectos del nopal sobre dichos productos, son atribuidos a la disminución de la tasa de reproducción de los microorganismos que causan la descomposición (Ortiz *et al.*, 2012).

(Moreno *et al.* (2013) y Ortiz *et al.*(2012) también reportaron el efecto positivo de *O. ficus-indica* sobre la producción de leche y posiblemente sobre la calidad de los

subproductos de esta respectivamente. La mejora en la producción láctea son atribuidos al efecto de los componentes del nopal (carbohidratos, fibra detergente neutra y acida, así como los niveles altos de calcio, entre otros más) mismos que son transformados a nivel ruminal, por la flora microbiana, e incrementan las proporciones de los productos finales de dicho proceso entre los cuales se encuentran los ácidos grasos volátiles (AGV), energía (ATP) y amoníaco (NH_3) (Araujo y Vergara, 2007).

Dentro de las partes del nopal que más se han estudiado se encuentra una sustancia viscosa llamada "mucílago", el cual forma parte de la fibra dietética y su composición química ha sido ya establecida (Méndez, 2006). Es un polímero cuyo peso molecular oscila alrededor de 13×10^6 g/mol y que está compuesto por polisacáridos emparentados con las pectinas (Ruiz y Guerrero, 2009). El mucílago del nopal es un polisacárido fibroso, altamente ramificado con muchos azúcares (Figura 1). Es una molécula larga y compleja (Gibson y Nobel, 1990).

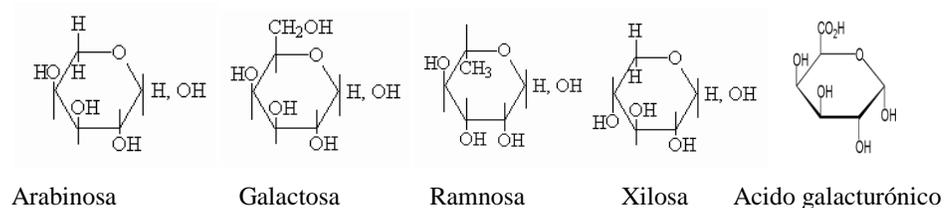


Figura 1. Estructuras químicas de los azúcares que componen el mucílago.

Fuente: Gibson y Nobel (1990)

Cada molécula de mucílago de *O. ficus-indica*, puede contener más de 30,000 subunidades de azúcar, o residuos. Los azúcares más abundantes arabinosa, galactosa,

ramnosa, y xilosa (Méndez, 2006). El mucílago también tiene una considerable cantidad de ácido galacturónico, el cual es un azúcar carboxilado. La molécula de mucílago tiende a ser fuertemente cargada negativamente, ya que los iones hidrógeno tienden a disociarse de la parte carboxílica, de las subunidades galacturónicas (Gibson y Nobel 1990). Esta electronegatividad en la parte carboxílica de la molécula del mucílago, y por lo que, el 20% del calcio insoluble en el tallo del nopal puede estar asociado con el mucílago (Ruiz y Guerrero, 2009). Esta asociación facilita además su permanencia en el aparato digestivo y promueve su absorción deficiente.

El mucílago consiste de aproximadamente 35 a 40% de arabinosa, 20 a 25% de galactosa y xilosa cada una, y de 7 a 8% de ramnosa y ácido galacturónico cada uno. Un polímero hipotético que contiene estos residuos de azúcares en aproximadamente estos porcentajes fue construido en base a la evidencia química disponible. El esqueleto de la molécula de mucílago consiste en residuos alternados de ramnosa y ácido galacturónico, los cuales están unidos a los lados por cadenas compuestas de tres residuos de galactosa. Los residuos de arabinosa y xilosa están ramificados en los lados de las cadenas de galactosa; xilosa parece estar unida a arabinosa, las cuales a su vez están ligadas a la galactosa (Méndez, 2006).

En otras especies de *Opuntia*, el mucílago está compuesto por los mismos residuos de azúcares, pero en diferentes porcentajes que *O. ficus-indica*. Las células del mucílago de las *Opuntias* que han sido estudiadas pueden ocupar cerca del 3% del volumen del tallo y pueden afectar el metabolismo de la planta en diferentes formas. Primero, al haber Ca^{+2} ligado al mucílago en grandes cantidades, las células del mucílago actúan como depósito de calcio para el tallo. Segundo, el agua puede estar ligada a muchos residuos de

azúcares de la molécula del mucílago afectando el estado de hidratación del tallo y tercero, el mucílago juega el papel de protección del nopal contra altas temperaturas (Ruiz y Guerrero, 2009).

En relación al mucílago y su papel de protección del nopal, aun no es claro, considerando la gran dimensión de las moléculas del mucílago y cómo estas podrían ingresar a las células del clorenquíma, donde probablemente la protección del daño térmico es más necesitada de acuerdo a Gibson y Nobel (1990). Se ha demostrado que el mucílago solo se encuentra en el aparato de Golgi y que su síntesis probablemente se lleva a cabo en éste (Ruiz y Guerrero, 2009).

El nopal siempre se ha utilizado en la alimentación de bovinos productores de carne y leche, caprinos y ovinos en las zonas del norte del país, principalmente. Los pequeños productores son los que comúnmente utilizan al nopal en la alimentación de su ganado, ya que en épocas críticas del año, es el único alimento que tienen disponible para la alimentación de sus animales. Algunos expertos consideran que el manejo (corte y acarreo) y utilización del nopal, es muy voluminoso y costoso en relación al valor nutritivo. Sin embargo, en el caso de los animales domésticos el nopal se usa como una dieta de mantenimiento junto con esquilmos agrícolas e industriales (Gutiérrez *et al.*, 2008). La opinión de algunos investigadores es que el nopal se justifica como fuente forrajera, ya que existen observaciones en el sentido de que el nopal estimula la producción de leche y mejora la calidad microbiológica de esta (Ortiz *et al.*, 2013); aunque aún no queda claro que elemento o elementos de nopal promueven el aumento en la síntesis de leche y provoca una disminución de cuentas bacterianas en la misma (Soria, 2010).

2.4 Efecto de la complementación de nopal (*O. ficus-indica*) a las dietas de bovinos productores de leche sobre calidad de la leche cruda.

García *et al.* (2005) y Ortiz *et al.* (2013), determinaron que al complementar la dieta de los bovinos con *Opuntia*, se incrementa no solo la producción de leche, sino que mejora la calidad y vida de almacén de los subproductos lácteos. En cuanto a la calidad de la leche y sus subproductos, es un hecho que la leche al interior de la cisterna (órgano de depósito de almacenamiento de leche de la vaca), es estéril. Sin embargo, una vez realizado el ordeño, ésta es susceptible de contaminarse con altas cargas bacterianas -parte de estas pueden ser patógenas- provenientes de la tierra y el estiércol presente en las ubres de las vacas (Magariños, 2000).

Dentro de la seguridad alimentaria, la inocuidad de los alimentos es uno de los conceptos clave, pues los pequeños productores, que obtienen leche de sus propios animales, la utilizan para consumo familiar y para la fabricación de quesos frescos artesanales destinados ya sea a la venta o para autoconsumo, conformando de esta forma una práctica sin controles sanitarios (Garcés *et al.*, 2005). De hecho, la posibilidad de crear marcas regionales para los quesos artesanales obligaría a que las cargas bacterianas fueran disminuidas, lo cual atentaría con las prácticas de producción del queso artesanal, con lo cual se podría modificar la calidad del producto artesanal.

Al parecer, los pectin-oligosacáridos del nopal estimulan el desarrollo de bifidobacterias (microorganismos que son denominados probióticos) y estas se asocian con

el estímulo del sistema inmune del hospedero y en consecuencia con el incremento de la resistencia contra la colonización de microorganismos patógenos (Paul, 2005; Guevara, 2009).

Asimismo, se ha establecido que, las plantas en general, además de tener defensas físicas, como la pared celular, también presentan defensas químicas, a base de compuestos metabólicos, como son los metabolitos secundarios (Langenheim, 1994). Estos metabolitos están almacenados en vacuolas u organelos y son liberados al citoplasma o espacio extracelular naturalmente (Agrios, 1996). Las plantas también generan compuestos químicos (fitoalexinas) como defensa inducida por la presencia de patógenos o estrés abiótico (Verpoorte, 2000). Sin embargo, algunos componentes constitutivos se liberan o incrementan en presencia de un ataque externo (Morrissey *et al.*, 1999; Nimchuk *et al.*, 2003; Mysore *et al.*, 2004; Glazebrook, 2005; Thatcher *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005). En síntesis, las plantas utilizan como sistema defensivo ante ataques de los patógenos sustancias como las antes mencionadas, lo que podría explicar porque el nopal tiene efectos bactericidas y la cual se ve reflejado en el número de UFC/mL, para el caso del conteo bacteriano en leche cruda y de UFC/gr en el caso del queso artesanal.

Otros compuestos que podrían explicar la actividad bacteriostática del nopal son, el ácido málico y el ácido cítrico (en menor grado); principales metabolitos secundarios del metabolismo del ácido crasuláceo (CAM) de las cactáceas (Andrade *et al.*, 2007): el ácido málico, está relacionado con la inhibición o suspensión del crecimiento de varias especies bacterianas en cactáceas. Su acción bacteriostática, parece estar basada, no solo en su poder acidificante, sino también, en la capacidad para penetrar a través de la pared celular del microorganismo, reduce el pH del citoplasma, incrementa los gastos energéticos, altera el

equilibrio osmótico y perjudica la síntesis de ADN, evitando la replicación de los microorganismos (Arango, 2010).

La naturaleza y distribución de las fitoalexinas en el reino vegetal se desconoce, además se ignora si son sintetizadas universalmente en las plantas superiores, pero se han identificado aproximadamente 16 familias, principalmente en las dicotiledóneas, entre ellas la familia *Cactacea*, del género *Opuntia* (Cortadi *et al.*, 2003). La producción de fitoalexinas, no solo es inducida por la presencia de hongos, bacterias, virus y otros patógenos (inductores de una infección), sino también por compuestos liberados de la hidrólisis enzimática de la pared celular de plantas, por daño mecánico y radiación ultravioleta, común en cactáceas (García y Pérez, 2003).

Existen otros componentes del nopal que actúan indirectamente sobre los microorganismos patógenos, ya que tienen un efecto prebiótico (Panesar *et al.*, 2013). Los prebióticos resisten la digestión en el estómago e intestino delgado, para ser selectivamente fermentados por bifidobacterias y lactobacilos (Paul, 2005). Estos microorganismos se denominan probióticos y se han asociado a efectos benéficos para la salud, como el incremento en la resistencia contra la colonización de microorganismos patógenos. Los pectin-oligosacáridos presentes en el nopal estimulan el desarrollo de Bifidobacterias, por su parte los mucílago-oligosacáridos generan un incremento de Lactobacilos (Guevara, 2009). La fermentación de pectin-oligosacáridos y mucílago-oligosacáridos, por parte de los probióticos, reduce el pH y consumen componentes que son vitales para otros microorganismos, impidiendo la contaminación por microorganismos patógenos (Guevara-Arauz *et al.*, 2012).

Una parte importante del nopal es la epidermis y dentro de esta, la cutícula juega un papel importante; la cutícula es una membrana lipídica extracelular continua, la cual es sintetizada por las células epidérmicas (Bargel *et al.*, 2006; Yeats *et al.*, 2010). Dicha estructura tiene como función aislar y proteger al cladodio del medio externo (Shepherd y Griffiths, 2006; Reina-Pinto y Yephremov, 2009); por lo que, constituye un elemento estructural de importancia funcional y ecológica, debido a que, es la capa más externa de las células vegetales que interacciona con el ambiente (Kunst y Samuels, 2003; Jeffree, 2006).

El papel fisiológico de la cutícula y ceras cuticulares incluye la regulación en la transpiración y mantenimiento del balance de agua (Veraverbeke *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003), regulación del intercambio de gases (Kolattukudy, 1996), protección contra patógenos y daños mecánicos (Commenil *et al.*, 1997) y protección contra la radiación ultravioleta y agentes contaminantes (Barnes *et al.*, 1996; Holroyd *et al.*, 2002). La resistencia que ofrece la cutícula a los daños mecánicos, a la difusión de gases, a los cambios en permeabilidad al agua y a la penetración de microorganismos, no dependen específicamente de su grosor, sino más bien de los cambios de la estructura cuticular (Knoche *et al.*, 2004; Rogiers *et al.*, 2004), de la variación de sus componentes (principalmente lípidos solubles cuticulares) y las proporciones en que éstos se encuentran (Verardo *et al.*, 2003; Matas *et al.*, 2004; Vogg *et al.*, 2004; Schreiber, 2005).

Desde un punto de vista morfológico, la cutícula cubre la pared celular de las células epidérmicas. Está compuesta por una cubierta superior de ceras epicuticulares, seguida por otra capa inferior formada por cutina y ceras mezcladas con sustancias de la pared celular, pectinas, celulosa y otros carbohidratos, los cuales constituyen la capa

cuticular (Kunst y Samuels, 2003; Jetter *et al.*, 2006; Domínguez *et al.*, 2011); capa que, según la especie, la puede variar de pocos microgramos a más de 1000 $\mu\text{g cm}^2$ y su grosor puede variar desde menos de 1 hasta 10 μm o más (Domínguez *et al.*, 2011; Yeats *et al.*, 2012). La función esencial de las ceras cuticulares es limitar la pérdida de agua por la cutícula, lo cual puede asociarse al complejo poliéster con ceras de naturaleza hidrofóbica y muy escasa reactividad, porque la mayoría de los grupos carboxílicos presentes en la membrana están esterificados con grupos hidroxilos alifáticos de otros ácidos grasos (Riederer, 2006; Domínguez *et al.*, 2011).

La separación física de la cutícula mediante solventes orgánicos y el análisis de sus componentes, han demostrado que las ceras intracuticulares están intercaladas dentro del polímero de la cutina y tienen una composición química distinta de las ceras epicuticulares que se encuentran en la superficie exterior de la cutina, en forma de una capa más o menos uniforme y amorfa o como cristales discontinuos (Bargel *et al.*, 2006; Samuels *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2011). El análisis de estas ceras han establecido que, los componentes de estas son muy variados y normalmente constituyen de 20 a 60 % de la masa de la cutícula (Heredia, 2003).

La cera cuticular es una mezcla compleja de compuestos alifáticos de cadenas lineales que varían entre 20 y 40 carbonos de tamaño; sin embargo, también se han identificado ésteres de cera con cadenas que van desde 36 hasta 70 carbonos (Reina-Pinto y Yephremov, 2009). Los principales componentes químicos de las ceras son n-alcanos, ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos grasos de cadena larga en el caso de las epicuticulares, o de ácidos grasos de cadena corta en las intracuticulares (Kunst y Samuels, 2003; Cameron *et al.*, 2006; Leide *et al.*, 2011). Así mismo, entre las ceras se han

encontrado algunos metabolitos secundarios como los triterpenoides, compuestos fenólicos (ácido cumárico y ferúlico, flavonoides, fenilpropanoides), polisacáridos (principalmente celulosa y pectina) y algunos polipéptidos (Stark y Tian, 2006; Jeffree, 2006; Riederer, 2006; Kunst y Samuels, 2009) y, los compuestos como los fenólicos y flavonoides están relacionados con la actividad bactericida de las cactáceas (Sánchez *et al.*, 2014).

De acuerdo con los párrafos anteriores, diversas sustancias o metabolitos que el nopal genera, podrían explicar el efecto de la disminución de UFC/mL de Mesófilas aerobias y coliformes totales, cuando este forraje se incluye a la dieta de los bovinos productores de leche o cuando se adiciona directamente a la leche cruda (Ortiz-Rodríguez *et al.*, 2012). Estas propiedades (bacteriostáticas) de los ácidos orgánicos, son aplicadas en la preservación de materias primas (Abraján, 2008) y las combinaciones entre dos o más ácidos orgánicos, combinan las propiedades conservantes y acidificantes de varios de ellos (Creus, 2005)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con los antecedentes, la seguridad alimentaria y la inocuidad deben ser conceptos clave, para los pequeños productores de leche quienes ofertan su producto y sus subproductos al consumidor de su localidad, conformando de esta forma una práctica sin controles sanitarios. Al parecer el uso del nopal (*O. ficus-indica*) disminuye los conteos de UFC/mL de mesófilas aerobias y coliformes totales, en la leche cruda. Sin embargo, no queda claro en donde podría estar el compuesto del nopal que actúa como bacteriostático: ¿en el mucílago, en la epidermis, o en la pulpa? El estudio preliminar en el que se basó esta investigación sugiere que es en la epidermis a una inclusión de 1.0% en base a 100 mL de leche cruda (Ortiz *et al.*, 2013), pero se requiere de profundizar en el estudio, si es la epidermis del nopal la que provee la acción bacteriostática. Pero además, es importante asegurar si las partes del nopal (epidermis, mucílago o pulpa) actúan inhibiendo el desarrollo bacteriano a través de una prueba, como lo es la prueba de sensibilidad en disco, utilizando como bacteria referente al *Staphylococcus aureus*.

4. HIPOTESIS

- La adición directa de la epidermis de nopal (*O. ficus-indica*) a la leche cruda mejora la calidad microbiológica de esta, puesto que la epidermis del cladodio al ser la primera barrera física contra patógenos provoca la disminución en el número de UFC/mL para bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales, en la leche cruda proveniente de sistemas familiares donde se carece de controles sanitarios e higiene de la ubre.

5. OBJETIVOS GENERALES

- Evaluar el efecto de la acción del nopal (*O. ficus-indica*) y sus partes (epidermis y mucílago líquido o deshidratado y pulpa) sobre *Staphylococcus aureus*, bajo la metodología de sensibilidad en disco.

5.1 Objetivos Específicos.

- Determinar el efecto de la adición directa de la epidermis del nopal (*Opuntia ficus-indica*) a la leche cruda sobre las cuentas bacterianas de mesófilas aerobias y coliformes totales.
- Evaluar el efecto de la adición directa del mucílago (líquido o deshidratado) de nopal (*Opuntia ficus-indica*), a la leche cruda sobre las cuentas bacterianas de mesófilas aerobias y coliformes totales.
- Establecer el efecto de la adición directa de la pulpa del nopal (*Opuntia ficus-indica*) a la leche cruda sobre las cuentas bacterianas de mesófilas aerobias y coliformes totales.
- Comparar el efecto de las diferentes partes de *Opuntia ficus-indica* (mucílago líquido, mucílago deshidratado, epidermis y pulpa) post-adición directa a la leche cruda sobre la disminución de UFC/mL de mesófilas aerobias y coliformes totales.
- Evaluar la epidermis, mucílago líquido, mucílago deshidratado y pulpa de nopal (*Opuntia ficus-indica*) sobre *Staphylococcus aureus* bajo la metodología de sensibilidad en disco.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Centro Multidisciplinarios en Estudios de Biotecnología (CMEB)-UMSNH, ubicado en Posta Zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UMSNH, ubicada en el Kilómetro 9.5 de la carretera Morelia-Zinapécuaro. Michoacán; (INEGI 2005; Servicio Meteorológico Nacional, 2000).

La investigación se realizó en tres etapas:

6.1 Primera etapa: se evaluó el efecto de la adición directa de la epidermis, mucílago líquido, mucílago deshidratado y pulpa de nopal (*Opuntia ficus-indica*) a la leche cruda inoculada con *Escherichia coli* más antibióticos sobre el número (\log_{10}) de UFC/mL para Bacterias Mesófilas Aerobias y Coliformes Totales.

6.1.1 Métodos

6.1.1.1 Inoculación a la leche cruda con la cepa *Escherichia coli* XL-1 Blue plsd1.4 y antibióticos (tetraciclina y ampicilina)

Se utilizó la cepa comercial *E.coli* XL-1 Blue (Stratagene) por ser una cepa modificada genéticamente (genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]*) para su uso en técnicas de biología molecular y que es resistente a tetraciclina por la presencia del transposón Tn10. A esta cepa, se le insertó previamente el plásmido plsd1.4 disponible en el laboratorio y que contiene el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina (Velázquez-Hernández et al., 2011). La inoculación a la leche cruda con la cepa *Escherichia coli* XL-1 Blue plsd1.4 (1×10^6 UFC/mL/100 mL de

leche), resistente a tetraciclina y ampicilina, se utilizó para disminuir la carga microbiana nativa tanto de la leche cruda como del nopal, y poder monitorear el efecto de los componentes del nopal directamente sobre la cepa resistente a ambos antibióticos. El objetivo de la adición de tetraciclina® (12 µg/mL) y ampicilina® (50 µg/mL) a la leche cruda, fue para disminuir la flora microbiana del nopal y descartar el posible efecto de la flora microbiana propia del nopal que, podría tener efecto antagónico sobre las bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales provenientes en leche cruda. De esta manera se estaría en posibilidad de establecer que, la disminución de las cuentas bacterianas en leche cruda por acción de la adición directa de las fracciones del nopal (FN) pudiera atribuirse a un compuesto fitoquímico propio de esta cactácea. Además, la esterilización del nopal o sus partes mediante métodos físicos de esterilización puede modificar la estructura química de esta planta, lo que ocasionaría resultados diversos, en relación a cuentas bacterianas, posteriores a la adición de FN a la leche cruda. La cepa se conservó en agar Luria-Bertani (LB) inclinado conteniendo 50 µg/mL de ampicilina y 12 µg/mL de tetraciclina, sembrado por estría y picadura y almacenado a 4°C. También se conservó una alícuota crecida por toda la noche en caldo LB con ambos antibióticos, a la que se adicionó y mezcló 15% de glicerol esteril y se conservó almacenada en ultracongelación a -70°C. Para preparar el inóculo la cepa se creció en medio LB que contenía ambos antibióticos hasta una densidad óptica de 0.0706, la cual contenía 1×10^6 de UFC/mL.

6.1.1.2 Extracción del Mucílago

La variedad de nopal de donde se extrajo el mucílago fue *O. ficus-indica*; para ello, se utilizaron 4.5 kg de nopal en base fresca, para obtener mucílago deshidratado (MD) y 3.5 Kg de nopal en base fresca, para obtener mucílago líquido (ML).

Para obtener MD, primeramente se realizó la extracción de mucílago a través de la metodología de Arizmendi (2004) modificada por Rodríguez *et al.* (2010). Previo a la obtención del mucílago se procedió a la desinfección de la superficie del nopal con una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 15 min, posteriormente se lavó consecutivamente con agua destilada esteril durante seis veces, para quitar los residuos de hipoclorito (Ortiz *et al.*, 2013). Inmediatamente después, se procedió a retirar la epidermis del nopal. El nopal sin epidermis se cortó en fracciones de 3x3 cm para su posterior molido en licuadora con etanol al 50% y agua destilada. La combinación de etanol y agua destilada se administró en la siguiente relación: 520 mL de etanol: 480 mL de agua destilada. Preparada la combinación de etanol y agua destilada, se procedió a depositar en la vaso de la licuadora 1L de la combinación etanol:agua y 1 kg de nopal sin epidermis para realizar el proceso de molido, El resultado del molido fue centrifugado a 2500 rpm durante 15 min. Inmediatamente después, se procedió a extraer el sobre nadante y, se precipitó con etanol al 96% en una relación de 1:4 (1 L de sobrenadante/4 L de etanol). El precipitado se deshidrato, en un deshidratador solar construido con aluminio y policarbonato, a una temperatura de promedio de 52.5°C. Una vez deshidratado el mucílago, se procedió a molerlo en licuadora. El resultado final de la deshidratación fue de 6.2 g de mucílago/kg de nopal en base fresca.

Para el caso de la extracción de ML, se procedió a la desinfección de los cladodios del nopal tal como se describió anteriormente para la obtención del MD. Posterior al a desinfección, se procedió a desprender la epidermis (Ep) del cladodio. El cladodio sin Ep se cortó en fracciones de 3x3 cm, mismas que se depositaron en bolsas Ziploc® para la trituración manual de las fracciones dentro de la misma bolsa y de esta manera acelerar la

obtención del mucílago. Obtenido el ML en la bolsa Ziploc®, este se vertió en una tela de algodón (tipo manta cielo) para filtrar únicamente el mucílago y dejar en la tela, las fracciones sólidas del cladodio. El mucílago filtrado se almacenó en tubos de ensayo, previamente esterilizados.

6.1.1.3 Extracción de la epidermis del cladodio de nopal

Para la extracción de Ep, primero se realizó la desinfección del cladodio del nopal, tal como se ha descrito en los párrafos anteriores. Una vez desinfectado el cladodio se procedió a hacer incisiones paralelas y longitudinales en la superficie del cladodio, estos cortes se realizaron con una hoja de bisturí y para separar Ep del resto de los componentes del nopal. Separada Ep fue depositada en tubos de ensayo previamente esterilizado.

6.1.1.4 Extracción de la pulpa del cladodio de nopal

Para la extracción de la pulpa (Pa), primeramente se separó Ep del cladodio del nopal. Posteriormente, se procedió hacer cortes transversales (con hoja de bisturí) lo cual permitió quitar la dermis y el xilema de ambas caras del cladodio, dejando al descubierto Pa, a la cual se hicieron pequeños cortes delgados (con hoja de bisturí), los cuales se introdujeron en frascos de cristal (previamente esterilizados) con agua destilada estéril. Los frascos de cristal con el contenido de Pa de nopal y agua destilada estéril fueron agitados de forma manual para acelerar la extracción y eliminación del mucílago. Este procedimiento se repitió cinco veces, es decir en cada ocasión se adicionaba agua destilada, se agitaba manualmente, se dejaba reposar (30 min) y se retiraba el agua mezclada con mucílago. Una vez realizada esta operación (cinco lavados), la Pa ya sin contenido de mucílago, se almacenó en tubos de ensayo previamente esterilizados.

6.1.1.5 Obtención de leche cruda y formación de grupos

La leche cruda se obtuvo de ocho vacas Holstein, pertenecientes a un sistema de producción familiar ubicado en la localidad de Uruétaro, Municipio de Tarimbaro, Michoacán., ubicado en el kilómetro 15 de la carretera Morelia-Zinapécuaro, Michoacán; cuyo clima es templado con lluvias en verano. Tiene una precipitación pluvial anual de 609.0 mm y temperaturas entre 2.5 a 25.1°C (INEGI 2005; Servicio Meteorológico Nacional, 2000).

Las vacas se ordeñaron dos veces al día. Una vez homogenizado el total de la producción de la leche del ordeño de la mañana, se recolectaron 2.0 L; mismos que se depositaron en un recipiente de plástico previamente esterilizado, para trasportarlos en hielera a 4°C (NOM-SSA-109-1994) al laboratorio del CMEB-FMVZ-UMSNH. Una vez en el laboratorio, los dos litros de leche fueron divididos en 20 muestras (100 mL/muestra). Cada muestra fue depositada en un frasco -previamente esterilizado con capacidad de 300 mL. La recolección, transporte y obtención de muestras de leche cruda se repitió durante cinco días. Ello originó un total de 100 muestras.

A cada muestra de leche se le adicionó de 0.0 o 1.0% de Ep, MD o ML y Pa, más 10^6 de *Escherichia coli* XL-1Blue plsd1.4 y antibióticos (50 µg/mL de ampicilina y 12 µg/mL de tetraciclina). La adición y nivel de cada PN, la inoculación de *Escherichia coli* y los antibióticos se realizó en función de la formación de grupos de análisis (Tabla 2). El porcentaje de adición de FN se realizó en base a 100 mL de leche cruda. Antes del análisis microbiológico de la leche cruda se dejó que el contacto directo de cada FN con la leche cruda fuera de 2 h.

6.1.1.6 Microbiológico de las Muestras

La preparación y análisis microbiológico de las muestras/grupo (5 muestras/grupo) se realizó bajo los criterios de las normas oficiales mexicanas: NOM-120-SS1-1994, NOM-113-SSA y NOM-110-SSA. El estudio bacteriológico se realizó en el CMEB-FMVZ-UMSNH, inmediatamente después de haberse cumplido el tiempo de contacto de Ep, MD o ML y Pa con la leche cruda (2 h).

De cada muestra/grupo, 2 h post adición de inóculo, antibiótico y FN, se tomó 1.0 mL, misma que se diluyó en 9.0 mL de solución reguladora de fosfatos. De esta dilución (10^{-1}) se obtuvieron diluciones decimales consecutivas hasta una dilución 10^{-6} . La inoculación para bacterias coliformes totales (CT) se realizó en el medio de Agar Bilis Rojo Violeta (Bioxon®) el cual se preparó en base a las indicaciones del fabricante. El medio se esterilizó en autoclave, se dejó enfriar a una temperatura de 40°C. Posteriormente, de cada dilución (leche cruda más inóculo, antibióticos y PN) se tomó 1 mL y se vertió en caja de Petri. Inmediatamente después, se agregaron 20 mL de Agar Bilis Rojo Violeta, cantidad que fue homogeneizada en el interior de la caja de Petri, ello de acuerdo a la norma NOM-113-SSA-1994. Homogenizado el medio de cultivo con el mL de la dilución se dejó solidificar la placa y se incubó a una temperatura de 37°C durante 24 h.

Para el caso de la determinación de bacterias mesófilas aerobias (BMA)/muestra, se inoculó en medio líquido Agar Cuenta Estándar (Bioxon®) y se realizó el mismo procedimiento utilizado en CT, mismo que fue descrito en el párrafo anterior. No obstante, para BMA se requirió incubar a 37°C durante 48 h.

El conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, tanto para CT como para BMA, se realizó mediante un contador de bacterias digital (Quebec).

6.1.2 Diseño estadístico

Para la evaluación del efecto de las FN sobre la carga microbiana de la leche cruda, se realizó un diseño estadístico factorial 2x2x5; lo cual produjo la formación de 20 grupos (Tabla 2), con cinco repeticiones por grupo.

Tabla 2. Conformación de los grupos de acuerdo al inóculo, antibiótico y partes de nopal

Grupo	Inóculo		Antibiótico		Parte del Nopal
	Bacteria	Adición	Antibióticos	Adición	
1	<i>Escherichia coli</i>	No	Tetraciclina y Ampicilina	Si	Epidermis
2	<i>Escherichia coli</i>	No	Tetraciclina y Ampicilina	Si	Mucílago líquido
3	<i>Escherichia coli</i>	No	Tetraciclina y Ampicilina	Si	Mucílago deshidratado
4	<i>Escherichia coli</i>	No	Tetraciclina y Ampicilina	Si	Pulpa
5	<i>Escherichia coli</i>	No	Tetraciclina y Ampicilina	Si	Sin Nopal
6	<i>Escherichia coli</i>	No	Tetraciclina y Ampicilina	No	Epidermis
7	<i>Escherichia coli</i>	No	Tetraciclina y Ampicilina	No	Mucílago líquido
8	<i>Escherichia coli</i>	No	Tetraciclina y Ampicilina	No	Mucílago deshidratado
9	<i>Escherichia coli</i>	No	Tetraciclina y Ampicilina	No	Pulpa
10	<i>Escherichia coli</i>	No	Tetraciclina y Ampicilina	No	Sin Nopal
11	<i>Escherichia coli</i>	Si	Tetraciclina y Ampicilina	Si	Epidermis
12	<i>Escherichia coli</i>	Si	Tetraciclina y Ampicilina	Si	Mucílago líquido
13	<i>Escherichia coli</i>	Si	Tetraciclina y Ampicilina	Si	Mucílago deshidratado
14	<i>Escherichia coli</i>	Si	Tetraciclina y Ampicilina	Si	Pulpa
15	<i>Escherichia coli</i>	Si	Tetraciclina y Ampicilina	Si	Sin Nopal
16	<i>Escherichia coli</i>	Si	Tetraciclina y Ampicilina	No	Epidermis
17	<i>Escherichia coli</i>	Si	Tetraciclina y Ampicilina	No	Mucílago líquido
18	<i>Escherichia coli</i>	Si	Tetraciclina y Ampicilina	No	Mucílago deshidratado
19	<i>Escherichia coli</i>	Si	Tetraciclina y Ampicilina	No	Pulpa
20	<i>Escherichia coli</i>	Si	Tetraciclina y Ampicilina	No	Sin Nopal

Con la información recabada se elaboró una base de datos para su análisis estadístico - previa transformación de los valores a Log₁₀-, a través de la metodología de los Modelos lineales generalizados (GLM, siglas en inglés) (SAS, 2000) y las diferencias estadísticas

entre grupos se obtuvieron mediante el método de medias de mínimos cuadrados (Lsmeans, siglas en inglés) (SAS, 2000).

6.2 Segunda etapa: En esta etapa se determinó el efecto de la epidermis, mucílago líquido, mucílago deshidratado y pulpa de nopal (*O.ficus-indica*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* bajo la metodología de sensibilidad en disco.

6.2.1 Métodos

6.2.1.1 Extracción del Mucílago, epidermis y pulpa para la prueba de antibiograma.

En la obtención de ML o MD, Ep y Pa del cladodio de *O. ficus-indica* se utilizó la misma metodología descrita en la primera etapa de esta investigación.

6.2.1.2 Crecimiento del *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)

Para el análisis del efecto de las partes del nopal (*O.ficus-indica*) a través del antibiograma, se utilizó la bacteria *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 29213) que es recomendada por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), para realizar pruebas de sensibilidad a antibióticos, de acuerdo con el protocolo M02-A10 "Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Tenth Edition". La prueba se realizó en el Centro Multidisciplinarios en Estudios de Biotecnología (CMEB)-UMSNH, ubicado en Posta Zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UMSNH.

Para el crecimiento del *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 29213) se procedió a la preparación del medio de cultivo. Para ello se utilizó el medio líquido Mueller Hinton (BDDIFCO®); cuyo procedimiento fue acorde a las indicaciones del fabricante. Se tomaron

5mL del medio de cultivo y se depositaron en tubos de ensayo con tapa rosca. Posteriormente los tubos de ensayo y su contenido se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 100°C. Una vez enfriados los tubos de ensayo, se inoculó el medio de cultivo con *S. aureus* (ATCC 29213) y se incubó a 37°C durante un periodo ≥ 6 h, puesto que se debe alcanzar o excede la turbidez de McFarland, misma que debe ser de 0.5 McFarland para antibiograma (CLSI, 2009). Sin embargo, cuando se excedió la turbidez, esta se ajusto con el medio líquido Mueller Hinton hasta lograr la turbidez requerida (0.5 McFarland) (CLSI, 2009); lo cual resulto en una suspensión que contenia aproximadamente entre 1 a 2×10^6 CFU/mL de bacteria analizada. Para establecer dicha turbidez se requirió de un espectrofotómetro (Microplate Manager 6; lector de microplacas iMARK™).

6.2.1.3 La inoculación de las placas

Para la inoculación de las placas se utilizó el medio de Agar Mueller Hinton (Bioxon®) el cual se preparó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El agar se depositó en un frasco de ½ L para esterilizarse en autoclave a una temperatura de 120°C. Esterilizado el agar se dejó enfriar a 45°C y se vertieron 20 mL/caja de Petri, de 150 mm de diámetro, para lograr un grosor de 4 mm de agar/caja. Vertidos los 20 mL de agar, a la caja de Petri, se dejaron solidificar y posteriormente, se eliminó la humedad de las placas en la campana de flujo laminar, proceso que duró aproximadamente 30 min. Eliminada la humedad de las placas se procedió a su inoculación con una suspensión de *S. aureus* con turbidez de 0.5 del nefelómetro de McFarland. La inoculación se realizó con un hisopo de algodón estéril impregnado con la bacteria: se frotó la superficie de la placa de agar con el hisopo varias veces para asegurar una distribución uniforme del inóculo en la placa de agar y posteriormente aplicar los discos impregnados con los antibióticos y con las FN.

6.2.1.4 Aplicación de los discos a placas de agar inoculado

Los discos utilizados en los antibiogramas se hicieron en el laboratorio de forma manual con papel absorbente, a excepción del disco con el antibiótico con amoxicilina (SENSI-DISC AMOXICILINA®); obteniéndose el control positivo. El disco impregnado de agua destilada estéril fungió como control negativo o testigo. Mientras que, los discos de los tratamientos fueron impregnados con 20 µl de las soluciones obtenidas de cada parte de nopal (E, ML, MD y P). La solución de cada parte de nopal se hizo al 1% en base a 100 mL de agua destilada estéril. Una vez que los discos fueron depositados sobre las placas inoculadas con *S. aureus*, se incubaron durante 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Finalmente, se procedió a hacer la lectura de las placas, para ello, se midió cada halo de inhibición de los diferentes discos a través de un vernier (Pretul®) y se tomaron las imágenes correspondientes.

6.2.2 Diseño estadístico

El diseño estadístico utilizado fue completamente al azar, con 10 repeticiones por tratamiento. Con la información recabada, se laboró una base de datos para su análisis estadístico, mediante la metodología de Modelos lineales generalizados (GLM siglas en inglés) (SAS, 2000). Las diferencias estadísticas entre tratamiento, se obtuvieron mediante el método de medias de mínimos cuadrados (Lsmeans, siglas en inglés) (SAS, 2000).

6.3 Tercera Etapa: Se evaluó (de forma exploratoria) el efecto de la cera cuticular del nopal sobre *S. aureus* bajo la metodología de sensibilidad en disco.

6.3.1. Métodos

6.3.1.1 Obtención de la cera cuticular del nopal (*Opuntia ficus-indica*)

Para la obtención de la cera cuticular (Cc) de *O.ficus-indica* se desinfectó el cladodio (como se describió anteriormente) y se procedió a raspar superficialmente la Ep, con un bisturí, para obtener 0.1 g de Cc; cantidad que, se depositó (junto con 1 mL de agua destilada estéril) en un tubo de ensayo previamente esterilizado. La mezcla de Cc y agua se utilizó para impregnar los discos para antibiograma.

6.3.1.2 Crecimiento e inoculación del *Staphylococcus aureus* (serotipo ATCC 29213) en placas y aplicación de los discos para el antibiograma

La metodología para el crecimiento, inoculación de *S. aureus* en placas y la impregnación de los discos con Ep se describieron en la etapa dos, de esta investigación. Mientras que, los discos para el tratamiento de Cc fueron impregnados con 20 µl de esta solución (0.1g de Cc en base a un mL de agua destilada estéril).

6.3.2 Diseño estadístico

Para esta etapa se utilizó un diseño estadístico completamente al azar, con 10 repeticiones por tratamiento. La información recabada, se analizó mediante la metodología del ANOVA (SAS, 2000) y las diferencias entre tratamientos se obtuvieron mediante el método de medias de mínimos cuadrados (Lsmeans, siglas en inglés) (SAS, 2000).

7. RESULTADOS

7.1. Resultados de la primera etapa de la investigación: Efecto de la adición directa de las FN a la leche cruda sobre BMA y CT

La adición directa de FN a la leche cruda afectó ($P < 0.001$) al número (Log_{10}) promedio de UFC/mL para BMA y CT. Dicho efecto concuerda con los resultados obtenidos por Ortiz *et al.* (2011) y Ortiz *et al.* (2013), en los cuales la adición directa de PN a la leche cruda afectó ($p < 0.05$) el número (Log_{10}) de UFC/mL para BMA y CT.

No obstante, en la presente investigación se optó adicionar antibiótico (50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina + 12 $\mu\text{g/mL}$ tetraciclina) a la leche cruda e inocular las muestra de leche cruda con *E. coli* ($1 \times 10^6/1$ mL de leche cruda) resistente a antibióticos, para establecer con mayor claridad la propiedad bacteriostática de FN sobre BMA y CT; ello con el objetivo de eliminar la carga bacteriana propia de la leche cruda y la posible flora bacteriana del nopal, siendo el inóculo (*E. coli*, resistente a antibióticos) el referente bacteriano a medir en el análisis de UFC/mL de las muestras post-adición de FN.

Para el caso del número (Log_{10}) de UFC/mL para BMA en leche cruda, se encontró que, la leche cruda sin adición de PN, sin inóculo y sin antibióticos contenía 7.3 ± 0.25 Log_{10} de UFC/mL para BMA; valor mayor ($P < 0.05$) a la carga bacteriana (BMA) de la leche cruda sin adición de FN, con inóculo y con antibióticos (6.4 ± 0.25 log_{10} de UFC/mL). Dichos valores se utilizaron como referente al comparar la acción de FN sobre BMA, cuando son adicionados directamente a la leche cruda. Así, la adición de epidermis mostró el mejor comportamiento ($P < 0.05$), puesto que el número (log_{10}) de UFC/mL para

BMA fue de $6.6 \pm 0.25 \text{ Log}_{10}$, para leche cruda con Ep, sin inóculo y sin antibiótico y de $5.0 \pm 0.25 \text{ Log}_{10}$, para leche cruda con Ep, con inóculo y antibióticos; promedios que fueron menores ($P < 0.05$) a los valores de referencia: 7.3 ± 0.25 y $6.4 \pm 0.25 \text{ Log}_{10}$, respectivamente.

Tabla 3. Medias de mínimos cuadrados para UFC/mL de bacterias mesófilas aerobias en leche de acuerdo al tratamiento con y sin inóculo y antibiótico y Fracciones de nopal.

Inclusión	Tratamiento (adición de FN)				
	Ep*	ML*	MD*	Pa*	Sin FN*
	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
Sin I y sin A	6.6 ^{a,1}	6.9 ^{a,1}	6.8 ^{a,1}	6.7 ^{ac,1}	7.3 ^{a,2}
Sin I y con A	4.7 ^{b,1}	4.9 ^{b,1}	5.1 ^{b,1}	5.2 ^{b,1}	5.3 ^{b,1}
Con I y sin A	6.8 ^{a,1}	7.0 ^{a,1}	6.9 ^{a,1}	7.5 ^{a,2}	7.4 ^{a,2}
Con I y con A.	5.0 ^{b,1}	5.6 ^{b,1,2}	5.9 ^{c,2}	6.1 ^{c,2,3}	6.4 ^{c,3}

*= E.E.=0.25 en todos los tratamientos

PN= Partes de nopal (*Opuntia ficus-indica*); I= Inóculo (*E. coli*); A= antibióticos (ampicilina + tetraciclina)
Ep= Epidermis; ML=Mucílago líquido; MD= Mucílago deshidratado; Pa= Pulpa

^{a, b, c} = Literales diferentes indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$) dentro de columna

^{1, 2} = Numerales diferentes indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$) dentro de fila

Un aspecto interesante a resaltar, fue el valor (Log_{10}) de UFC/mL, para BMA, encontrado en el testigo (sin FN, sin inóculo y con antibiótico): 5.3 ± 0.25 , lo que sugiere que, en este tratamiento podrían estar bacterias (BMA) resistentes a los antibióticos incluidos a la leche cruda (ampicilina y tetraciclina). No obstante, cuando la leche cruda no fue inoculada con *E. coli*, pero se le adicionó Ep y se incluyeron antibióticos, las UFC/mL fueron de $4.7 \pm 0.25 \text{ Log}_{10}$, valor que muestra una tendencia a la disminución de cuentas bacterianas de BMA en la leche cruda (4.7 ± 0.25 vs $5.3 \pm 0.25 \text{ Log}_{10}$).

En lo referente al resto de los tratamientos analizados (FN) se encontró que el ML, MD y Pa mostraron valores (Log_{10}) menores ($P < 0.05$) a los tratamientos sin FN, sin embargo, dichos valores fueron estadísticamente iguales ($P > 0.05$) a los tratamientos con epidermis, a excepción de los tratamientos con Pa. No obstante, los valores de los

tratamientos con epidermis mostraron una tendencia hacia un menor número (Log_{10}) de UFC/mL de BMA en leche cruda (Tabla 3). En síntesis, la adición directa de Ep de nopal (*O. ficus-indica*) mostraron un mejor comportamiento en la reducción en el número (Log_{10}) de UFC/mL de BMA en leche cruda. Lo que sugiere que en esta FN se encuentran los compuestos químicos responsables de la inhibición del crecimiento bacteriano de la leche cruda.

Con respecto a los valores (Log_{10}) de UFC/mL para CT en leche cruda, se encontró que, el número de UFC/mL en el tratamiento testigo (sin adición de FN, sin inóculo y sin antibiótico a leche cruda) fue de 6.8 ± 0.25 , mientras que, en el tratamiento sin FN, con inóculo y antibióticos fue de $4.4 \pm 0.25 \text{ log}_{10}$ de UFC/mL, ambos valores diferentes entre sí ($P < 0.05$). De la misma forma que se hizo con BMA, los valores anteriormente citados se utilizaron como referente al comparar la acción de FN sobre CT, cuando son adicionados directamente a la leche cruda (Tabla 4.).

Tabla 4. Medias de mínimos cuadrados para UFC/mL de Coliformes Totales en leche de acuerdo al tratamiento y a la inclusión o no de inóculo y antibióticos.

Inclusión	Tratamientos (adición de FN)				
	Ep*	ML*	MD*	Pa*	Sin FN*
	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
Sin I y sin A	5.4 ^{a1}	6.1 ^{a2}	6.1 ^{a2}	5.9 ^{a1,2}	6.8 ^{a3}
Sin I y con A.	3.1 ^{b,1}	3.9 ^{b2}	4.0 ^{b,2}	2.9 ^{b,1}	4.2 ^{b,2}
Con I y sin A	5.5 ^{a,1}	5.7 ^{a,1}	5.7 ^{a,1}	5.5 ^{a,1}	6.2 ^{a,2}
Con I y con A.	3.9 ^{c,1}	4.3 ^{b,1}	4.3 ^{b,1}	4.2 ^{c,1}	4.4 ^{b,1}

*=E.E.=0.25 en todos los tratamientos

PN= Partes de nopal (*Opuntia ficus-indica*); I= Inóculo (*E. coli*); A= antibióticos (ampicilina + tetraciclina)
Ep= Epidermis; ML=Mucílago líquido; MD= Mucílago deshidratado; Pa= Pulpa

^{a, b, c} = Literales diferentes indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$) dentro de columna

^{1, 2} = Numerales diferentes indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$) dentro de fila

Se pudo determinar que, el tratamiento de la leche cruda con Ep de *O. ficus-indica*, sin inclusión de inóculo y sin antibiótico redujo la carga bacteriana de CT (5.4 ± 0.25

Log₁₀) en comparación con el tratamiento testigo (sin PN, sin inóculo y sin antibióticos: 6.8 ± 0.25 Log₁₀; e incluso fue menor ($P < 0.05$) al resto de los tratamientos (ML, MD y Pa) sin inclusión de inóculo y de antibióticos (Tabla 4.)

También se pudo observar que, los tratamientos con Ep sin la inclusión, a la leche cruda, del inóculo pero con inclusión de los antibióticos (ampicilina + tetraciclina) produjo el menor conteo (log₁₀) de UFC/mL para CT ($P < 0.05$): 3.1 ± 0.25 Log₁₀, pero además, fue menor ($P < 0.05$) al tratamiento testigo (sin PN, sin inóculo y con antibiótico): 4.2 ± 0.25 Log₁₀ (Tabla 4).

En relación al resto de los tratamientos (ML, MD y Pa) a la leche cruda más la inclusión o no de inóculo y antibióticos estos presentaron valores (Log₁₀) mayores ($P < 0.05$) a los tratamientos con Ep, específicamente cuando se compara el ML, MD y Pa más la inclusión de inóculo y sin antibiótico, así como ML, MD y Pa sin la inclusión del inóculo y con antibióticos (Tabla 4). No obstante, cuando se analizan los valores (Log₁₀) de UFC/mL de CT cuando a la leche cruda es inoculada (*E. coli*) pero no se le incluyen los antibióticos las diferentes FN producen valores iguales ($P > 0.05$) dentro de un rango de 5.5 a 5.7 log₁₀ UFC/mL pero menores ($P < 0.05$) al tratamiento testigo (sin FN, con inóculo y sin antibióticos): 6.2 ± 0.25 log₁₀ (Tabla 4).

De acuerdo con estos resultados, se puede sugerir que la adición directa de Ep de nopal (*O. ficus-indica*) a la leche cruda es el mejor tratamiento; puesto que, presentó un mejor comportamiento en la reducción del número (Log₁₀) de UFC/mL de CT en leche cruda, en comparación con el resto de las fracciones del nopal analizadas.

De las tablas 3 y 4 se puede observar también que: 1) existe una presencia importante de bacterias nativas de la leche, resistente a los antibióticos; 2) La diversidad bacteriana de la leche enmascara el efecto de la Ep sobre el conteo de BMA y CT, ya que al disminuir la población bacteriana con la adición de antibióticos, el efecto es más evidente.

7.2. Resultados de la segunda etapa: Determinación del efecto de las partes del nopal (*O. ficus-indica*) sobre el crecimiento del *S. aureus* (cepa ATCC 29213) a través de la metodología de sensibilidad en disco.

La prueba de la sensibilidad en disco o método de Kirby y Bauer, es un método para evaluar el comportamiento de los antimicrobianos frente a los diferentes microorganismos. El objetivo de la prueba de sensibilidad en disco es tratar de reproducir, experimentalmente, lo que pudiera ocurrirle a determinado microorganismo cuando es expuesto a uno o diversos antimicrobianos (Sánchez y Feris, 1998). Para fines de la presentación de los resultados obtenidos en esta investigación es necesario establecer que, las investigaciones en torno al efecto de *Opuntia* ssp sobre la inhibición del crecimiento de diversos microorganismos patógenos han señalado que esta acción es del tipo bacteriostático más que del tipo antibiótico (Almenares, 2012). Se entiende por antibiótico a toda aquella sustancia química que, produce la muerte o impide el crecimiento de ciertos microorganismos patógenos o no y que son sensibles a dicha sustancia. Mientras que, un bacteriostático es una sustancia o agente físico que dificulta la reproducción bacteriana sin

llegar a destruirlas (Sumano y Ocampo, 2006), aspecto que concuerda con los resultados obtenidos en la primera etapa de esta investigación.

Para el caso de los resultados específicos de esta segunda etapa, se encontró efecto ($P < 0.001$) del tratamiento sobre la inhibición del halo de crecimiento del *S. aureus*. A este respecto, se encontró que los tratamientos (FN) mostraron valores, de inhibición del halo de crecimiento de dicha bacteria, cuya interpretación revelo resistencia a PN evaluadas, únicamente la amoxicilina (testigo positivo) logró un valor promedio (6.15 ± 0.07 mm) que permitió interpretarse como sensible (Tabla 6). No obstante, como se estableció en el párrafo anterior, el nopal (*O. ficus-indica*) no posee compuestos fitoquímicos que puedan considerarse como sustancias con carácter de antibiótico, sino más bien, estas poseen propiedad bacteriostáticas.

Tabla 5. Medias de mínimos cuadrados de halo de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 29213) e interpretación del antibiograma de acuerdo al tratamiento.

Tratamiento	Halo de inhibición*	Interpretación
	\bar{X} (mm)	
Epidermis	0.75 ^a	Resistente
Mucílago Líquido	0.50 ^b	Resistente
Mucílago Deshidratado	0.15 ^c	Resistente
Pulpa	0.20 ^c	Resistente
Amoxicilina® (Testigo positivo)	6.15 ^d	Sensible
Agua destilada estéril (Testigo negativo)	0.00 ^e	Resistente

*=E.E.=0.07 en todos los tratamientos

a, b, c, d, e= Literales diferentes indican diferencias ($P < 0.05$) entre promedios

El análisis del halo de inhibición permitió establecer que Ep del nopal es la que presento un halo de inhibición mayor ($p < 0.05$) en el crecimiento de la cepa de *S. aureus* (ATCC 29213) a 24 h posteriores a la incubación (0.75 ± 0.07 mm), ello en comparación

con el resto de PN evaluadas, en el antibiograma, quienes mostraron un valor promedio en los halos de inhibición de 50 mm o menos. Sin embargo, los discos impregnados con MD fueron los que menor valor presentaron ($P < 0.05$): 0.15 ± 0.07 mm de halo de inhibición (Tabla 5). Como se pudo observar, los resultados obtenidos a través de la prueba de sensibilidad en disco, específicamente al valor promedio encontrado en los discos impregnados con Ep, refuerzan los resultados encontrados en la primera etapa de esta investigación: la FN que mejores resultados brinda, al evaluarse como un inhibidor del crecimiento, es la Ep del nopal.

7.3. Resultados de la tercera etapa: efecto de la cera cuticular de *O. ficus-indica* sobre el crecimiento de *S. aureus* bajo la metodología del antibiograma.

Esta etapa, surge a raíz de que Ep del nopal está compuesta por la cutícula (en donde se deposita la cera, tanto en la superficie como en la matriz de la misma) y por dos a tres capas de células epidermoides (Jiménez y Szudsuki, 1999), de aquí que, surgiera la siguiente pregunta, ¿la sustancia que provee la capacidad bacteriostática de la epidermis también se podrá encontrar en la Cc? Puesto que, las cactáceas (*Opuntia* spp) se caracterizan por la disposición de grandes cantidades de cera (Ting y Zsarck, 1975; citado por Silva *et al.*, 2001) y, la química y la estructura de cutina y ceras (cutícula) evitan la entrada de los microorganismos al cladodio (Gibson y Novel, 1986; citado por Silva *et al.*, 2001)

Los resultados de los discos impregnados con la suspensión de Cc del nopal mostraron un mayor diámetro de halo de inhibición del crecimiento de *S. aureus* ($P < 0.05$) en comparación con el valor del halo de inhibición de Ep: 2.00 ± 0.07 y 0.75 ± 0.07 mm, respectivamente (Tabla 6). Estos resultados podrían sugerir, que la inhibición del crecimiento causada por la Ep se deba a la parte proporcional de la cera contenida en la fracción (1.0% en base 100 mL de agua destilada o en leche cruda) adicionada directamente a la leche cruda.

Tabla 6. Medias de mínimos cuadrados de halo de inhibición e interpretación para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 de acuerdo al tratamiento.

Tratamiento	Halo de inhibición*	
	\bar{X} (mm)	Interpretación
Cera de Epidermis	2.00 ^a	Resistente
Epidermis	0.75 ^b	Resistente
Amoxicilina® (Testigo positivo)	6.15 ^c	Sensible
Agua destilada estéril (Testigo negativo)	0.00 ^d	Resistente

*=E.E.=0.07 en todos los tratamientos

a, b, c, d = Literales diferentes indican diferencias ($P < 0.05$) entre promedios.

8. DISCUSION

De acuerdo con los resultados obtenidos la fracción del nopal (*O. ficus-indica*) que presentó mayor inhibición del crecimiento contra mesófilas aerobias y coliformes totales, fue la epidermis en contacto directo con la leche cruda o al probarlo con la prueba de sensibilidad en disco frente a la bacteria *S. aureus* (serotipo ATCC 29213). Al respecto, Glazebrook (2005), Thatcher *et al.* (2005) y Wiermer *et al.* (2005), establecieron que, el efecto de la epidermis sobre la inhibición del crecimiento bacteriano, puede deberse a que esta parte del nopal, es la primera barrera de defensa física y, por lo tanto, posee un sistema de defensa, contra el ataque de patógenos, tales como fitoalexinas o la fitoanticipinas cuya presencia aumenta de forma considerable en respuesta a una invasión microbiana (Domingo y López, 2003).

Otra posible explicación a la acción bacteriostática de la epidermis del nopal, es que las cactáceas (*Opuntia ssp*) poseen propiedades naturales antibacterianas, mismas que están relacionadas con el metabolismo ácido crasuláceo (CAM) de las plantas, el cual inhibe o suspende el crecimiento de varias especies bacterianas (Arango, 2010). Así, el ácido málico y el ácido cítrico (en menor grado), son los principales metabolitos secundarios del CAM (Andrade *et al.*, 2007) y, el ácido málico, está relacionado con la inhibición o suspensión del crecimiento de varias especies bacterianas en cactáceas (Guevara, 2009).

Estudios actuales sobre la actividad antimicrobiana de algunas cactáceas, tal como *Opuntia matudae*, se puede explicar a través del contenido de varios compuestos activos presentes en estas plantas, dentro de los cuales están los compuestos fenólicos, ácido ascórbico y betalainas (Hayek y Ibrahim, 2012). Se ha establecido que *Opuntia ssp* tiene

una combinación de compuestos fenólicos en los cuales se puede incluir el gálico, vanílico, ácidos 4-hidroxibenzoico, catequinas, epicatequinas y Vainillina (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2010). Así mismo en un estudio realizado por Sánchez *et al.* (2014) informaron de efecto antimicrobiano de los extractos de diferentes especies de *Opuntia* en *Campilobacter jejuni*, *Vibrio cholera* y *Clostridium perfringens*. Estos autores relacionan la actividad bactericida con los compuestos fenólicos y flavonoides que se encuentran en los extractos de disolventes en *Opuntia*. Además, Kim *et al.* (2002) encontraron la inhibición de la actividad de *Salmonella* spp y *Escherichia coli* a partir de extractos de *O. ficus-indica*, en estudios realizados *in vitro*. En los estudios en los extractos de pruebas *in vivo* de *O. ficus-indica*, no se observó la presencia de *Salmonella typhimurium* DT104 en las heces y en el tracto intestinal de los ratones previamente inoculados con el microorganismo; sin embargo, aún no está claro el mecanismo antimicrobiano de estos compuestos. Se sugiere que, los compuestos fenólicos alteran la permeabilidad celular microbiana, lo que ocasiona la pérdida de macromoléculas desde el interior de la célula (El-Mostafa *et al.*, 2014).

Un metabolito secundario de las cactáceas que se sabe que posee acción antimicrobiana es el ácido málico; el cual basa su actividad no solo en su poder acidificante, sino también, en la capacidad para penetrar a través de la pared celular, alterar la homeóstasis del microorganismo y perjudicar la síntesis de ADN, evitando la replicación de los microorganismos (Lozano, 2006 y Arango, 2010); así lo han probado los extractos de *O. ficus-indica* al inhibir el crecimiento de *Campilobacter jejuni* y *Campilobacter coli* (El-Mostafa *et al.*, 2014). La actividad antimicrobiana de *O. ficus-indica* se asocia a los extractos metanólicos, mismos que causan disrupción de la membrana celular de la bacteria lo que genera el incremento de la permeabilidad y la disrupción del pH interno y

disminución energética de la bacteria, al limitarse la producción de ATP (El-Mostafa *et al.*, 2014).

Los compuestos fenólicos interfieren con la función de la membrana al interactuar con proteínas de la misma, lo cual causa deformación y funcionalidad de la membrana celular microbiana (Bajpai *et al.*, 2008), ocasionado la alteración del equilibrio osmótico, lo cual inhibe el crecimiento de los microorganismos (Lozano, 2006 y Arango, 2010).

Existe otra posible explicación, las especies de *Opuntia* tiene propiedades antibacterianas, atribuidas principalmente a la presencia de oligosacáridos pécticas (Guevara-Arauz *et al.*, 2012), lo que puede explicar la reducción de bacterias aerobias mesófilas y coliformes totales, cuando se añadió mucílago de *Opuntia* para la leche cruda. Así mismo, Panesar *et al.* (2013) describieron que los oligosacáridos promueve el crecimiento de bifidobacterias que se asocian con el estímulo del sistema inmune del huésped y, en consecuencia, con la resistencia contra la colonización de microorganismos patógenos. Al respecto, *Opuntia*, también promueve los beneficios descritos por Panesar *et al.* (2013), ya que contiene pectina-oligosacáridos (Guevara-Arauz *et al.*, 2012).

Con respecto a los resultados, en donde la cera cuticular de *O. ficus-indica* mostró un mejor desempeño en la inhibición del halo de crecimiento de *S. aureus* (ATCC 29213) en comparación con el resto de las fracciones del nopal (Epidermis, mucílago líquido o deshidratado y pulpa) analizadas bajo la prueba de sensibilidad en disco, Commenil *et al.* (1997) establecieron que, las ceras cuticulares de las plantas además de desempeñar varias funciones protectoras juegan un papel importante en la protección contra patógenos. En relación con el papel fisiológico de las ceras cuticulares, además de las mencionadas, estas

regulan la transpiración y mantienen el balance de agua (Veraverbeke *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003), regulan el intercambio de gases (Kolattukudy, 1996) y ofrecen protección contra la radiación ultravioleta y agentes contaminantes (Barnes *et al.*, 1996; Holroyd *et al.*, 2002).

La resistencia que ofrece la cutícula a la penetración de microorganismos, no dependen específicamente de su grosor, sino más bien de los cambios de la estructura cuticular (Knoche *et al.*, 2004; Rogiers *et al.*, 2004), de la variación de sus componentes (principalmente lípidos solubles cuticulares) y las proporciones en que éstos se encuentran (Hauke y Schreiber, 1998; Riederer y Schreiber, 2001; Verardo *et al.*, 2003; Matas *et al.*, 2004; Vogg *et al.*, 2004; Schreiber, 2005). Así mismo, entre las ceras se han encontrado algunos metabolitos secundarios como los triterpenoides, compuestos fenólicos (ácido cumárico y ferúlico, flavonoides, fenilpropanoides) (Stark y Tian, 2006; Jeffree, 2006; Riederer, 2006; Kunst y Samuels, 2009) y, los compuestos secundarios como los fenólicos y flavonoides están relacionados con la actividad bactericida de las cactáceas (Sánchez *et al.*, 2014).

9. CONCLUSIONES

El contacto directo de las fracciones de nopal (*O. ficus-indica*), como epidermis y mucílago líquido, a leche cruda inoculada o no con *Escherichia coli* XL-1 Blue plsd1.4 resistente a tetraciclina y ampicilina, lograron reducir el número (Log_{10}) de UFC/mL de bacterias mesófilas aerobias. Sin embargo, la epidermis de nopal presenta tendencia hacia una mayor acción inhibitor del crecimiento microbiano en comparación con el mucílago líquido. Mientras que, la pulpa de nopal o el mucílago deshidratado, no logran reducir el número (Log_{10}) de UFC/mL de bacterias mesófilas aerobias. Por lo que, estas fracciones de nopal o no cuentan o poseen menores cantidades de compuestos fitoquímicos con acción bacteriostática. Aspecto reforzado con el análisis del de sensibilidad en disco: la epidermis es la parte del nopal que produce mayor inhibición del halo de crecimiento de *Staphylococcus aureus*, serotipo ATCC29213; aunque si bien, la interpretación de la prueba de sensibilidad en disco determina que *Staphylococcus aureus* ante la epidermis es resistente.

En relación a la acción inhibitor del crecimiento de las fracciones del nopal sobre bacterias coliformes totales en leche cruda, la epidermis logra una mejor respuesta cuando está en contacto directo con la leche cruda sin la inclusión del inóculo (*Escherichia coli*, XL-1 Blue plsd.14) y sin adición de antibióticos (tetraciclina y ampicilina). No obstante, cuando la leche es inoculada con dicha bacteria resistente a los antibióticos y se le adiciona tetraciclina y ampicilina, las partes del nopal evaluadas se comportan estadísticamente ($P < 0.05$) igual en la disminución del número (Log_{10}) de UFC/mL en leche cruda; aunque si bien, se observa un tendencia hacia una mayor disminución de UFC/mL de coliformes totales en leche cruda cuando está en contacto directo con la epidermis del nopal. Esta

tendencia de la epidermis sobre la disminución de cuentas bacterianas de coliformes totales se refuerza con lo observado en el antibiograma, en donde la epidermis afecta ($P < 0.05$) el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus*, serotipo ATCC29213, en mayor medida que el mucílago (líquido o deshidratado) y que la pulpa de nopal.

La acción bacteriostática de la epidermis del nopal (*O. ficus-indica*) puede explicarse por los compuestos fitoquímicos (metanólicos y flavonoides) que contienen las ceras de la cutícula epidermal. Aspecto que fue confirmado con la metodología del antibiograma; en dónde, *Staphylococcus aureus*, fue la bacteria de referencia para observar los halos de inhibición mediante discos impregnados con solución de epidermis o mucílago (deshidratado o líquido) o pulpa o cera cuticular.

Estos hallazgos sugieren la posibilidad de utilizar la epidermis o las ceras cuticulares del nopal (*O. ficus-indica*) o ambas, como promotores de calidad bacteriana de la leche cruda, sobre todo para los sistemas de producción de leche a escala familiar donde las condiciones de salud e higiene de la ubre de las vacas es deficiente. Asegurando con ello, que el autoconsumo de la leche y la fabricación de subproductos de la misma (queso fresco) en las zonas rurales presente menor riesgo para la salud de las familias (que se dedican a esta actividad) y para la población que adquiere estos productos en los mercados locales.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abraján, V.M.A. 2008. Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago del nopal (*opuntia ficus-indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible. Tesis doctoral. Departamento de tecnología de alimentos. Universidad politécnica de valencia. Valencia, España. Pp -10, 22 – 25, 85-91.
- Andrade, J. L., Barrera, E., Reyes, G. C., Ricalde, M. F., Vargas, S. G., J. Cervera, C. 2007. El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. Boletín de la Sociedad Botánica de México, núm. 81, Pp. 37-50. (<http://dspace.upv.es/xmlui/bitstream/handle/10251/3794/tesisUPV2920.pdf?sequence=1>)
- Arango A.G.J. 2010. Metabolismo Acido de las Crasulaceas CAM. Introducción al metabolismo secundario. Facultad de Química Farmacéutica. UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA. [en línea] <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/shikimico.pdf>
- Araujo F. O. y Vergara, L. J. 2007. Propiedades físicas y químicas del rumen. Sitio Argentino de Producción Animal. Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol. 15 (Supl. 1).Pp 12-22.
- Álvarez F. G., Herrera H. J.G., Alonso B G., Barreras S. A. (2012) Calidad de la leche cruda en unidades de producción familiar del sur de Ciudad de México. Arch Med Vet 44. Pp,237,242.
- Agrios G. N., 1996. Fitopatología. Ed. Limusa México, D.F. P. 838.
- Almenares C. C. de J. 2012., Manual de Asepsia y Antisepsia., Instituto Nacional de Cancerología. México DF. Pp 6-8.
- Barbano D. M Y Santos M. M. V., 2006. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. J Dairy Sci 89(E Suppl.), Pp.15-19.
- Barnes J., Percy K., Paul N., Jones P., McLaughlin C., Mullineaux P., Creissen G., Wellburn A., 1996 The influence of UV-radiation on the physiochemical nature of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf surface. J. Exp. Bot. 47. Pp 99-109.
- Bargel H., Koch K, Cerman Z., Neinhuis C., 2006. Structure–function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes—a smart material Funct. Plant Biol. 33.Pp 893-910.
- Bezerra, A.D., Andrade F.M., Chaves V. A., Lima W.W., Evandro S.L., Ramos F.deC., Souza A.K., Samay de M.W., 2002. Digestibilidade e bsorção Aparentes em Vacas da Raça Holandesa Alimentadas com Palma Forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) em Substituição à Silagem de Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). R. Bras. Zootec., 31:5. Pp 2088-2097.
- Beiza MI, Ramírez GRE, Tzintzun RR, Val A. D.,2007. Efecto de la calidad de la leche en el rendimiento del queso. 1er Congreso Regional de BUIATRIA. Memorias. Morelia Mich. Pp. 161-168.

- CLSI, 2009, Clinical and Laboratory Standards Institute recommended M02-A10 Vol. 29 No. 1 Replaces M02-A9 Vol. 26 No. 1. Pp
- Carrión G.M., Flores M.R., González V.J., 2007. Estudio Microbiológico de la leche cruda entera en explotaciones bovinas lecheras del Noroeste de Michoacán. 1er Congreso Regional de BUIATRÍA. Memorias. Morelia Mich. Pp. 148-154.
- Cameron K. D., Teece M. A., Smart L. B. 2006. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiol.* 140.Pp. 176-183.
- Carrión G.M., Flores M.R., Caravero D.J.M., Núñez S.M., 2009. Aparición de mastitis bovina en dos establos del Estado de Michoacán, México, sus agentes etiológicos y la resistencia a antimicrobianos. 5to Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología. Morelia, Michoacán. P 144.
- Caraveo D.J.M., Flores M.R., Carrion G. M., 2007. Prevalencia de *Staphiloccocus* áureos causantes de mastitis clínica en bovinos. 1er Congreso Regional de BUIATRÍA. Memorias. Morelia Mich. Pp 106-110.
- Ceron C.T.G., 2008. Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* encapsulado. Universidad de las Américas Puebla. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Escuela de Ingeniería y Ciencias. Puebla, Puebla, México.
- Cervantes E.F., Santoyo C.H., Álvarez M.A., 2001. Lechería Familiar: factores de éxito para el negocio. Plaza y Valdés Editores S.A. de C.V., México D.F., México, Pp 165-188.
- Cortadi, A., Priolo, N., Uttaro, A., Gattuso, M., 2003. Dicotiledoneas. XXIX Jornadas Argentinas de Botánica & XV Reunión Anual de la Sociedad Botánica de Chile. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 38 (Supl.).
- Commenil P, L Brunet, J Audran (1997) The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. *J. Exp. Bot.* 48:1599-1607.
- Creus, E. 2005. Salmonella en la alimentación animal. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Christen G.L.P.M., Davison.J.S., Mc Allister, Roth L.A. 1993. Coliform and other indicator bacteria. In Marshall, R.T.(Ed) Standard methods for the microbiological examination of dairy products, 16th ed. American Public Health. Pp 247 – 252.
- Delgado R.L.C., Maurtua-Torres D.J., 2003. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus spp.* *Rev. Panamer. Salud Pública* 14:158-163.
- Domingo D., López B. M., 2003. Plantas con acción Microbiana. *Rev. Española Quimioterap* Vol. 16 (No. 4): 385-393. Prousciens, S. A. Sociedad Española de quimioterapia. Madrid España. Pp 386 - 388.

- Domínguez E, J A Heredia-Guerrero, A Heredia (2011) The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol.* 189:938-949.
- Espinosa, V., Rivera, G., y García, L. 2007. Utilidades económicas generadas por la lechería familiar. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente.* Vol. 7. No. 14 pp. 19-41.
- Farkye YN. 2002. Microbiology of soft cheese. In: *Dairy Microbiology Handbook.* 3th Ed. Robinson RK, pp. 479-453. Inc. New York, USA.
- FDA. Food and Drug Administration [FDA] Statement (2005) FDA issues health advisory about certain soft cheese made from raw milk.
- Flores M. R., Carrión G.M., Nuñez S. M. y Basrreera C.H., 2009. Calidad sanitaria del proceso de extracción de la leche cruda entera del municipio de Sahuayo, Michoacán. 5to Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología. Morelia, Michoacán. P 323.
- Flores V., C. A. 2001. El uso del nopal como forraje en el mundo. En Flores V. C. A. *Memorias del curso-taller El nopal forrajero, una alternativa alimentaria para el ganado.* Guadalupe, N.L. 19 de abril de 2001.
- Garcés R., Brito C., Cabello, M., Orellana A., Brandl. E. López J.L. 2005. Determinación de la calidad microbiológica de la leche cruda y del queso artesanal elaborado en una cooperativa de campesinas en una zona del centro-sur de Chile. *Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos* 366: 62-69.
- García-Muñoz J G, Mariscal-Aguayo D V, Caldera-Navarrete N A, Ramírez-Valverde R, Estrella-Quintero H y Núñez-Domínguez R 2007 Variables relacionadas con la producción de leche de ganado Holstein en agroempresas familiares con Diferente nivel tecnológico. *INTERCIENCIA VOL. 32 N° 12*
- García H.L.A., Aguilar V.A., Luévano G.A. y Cabral M.A. 2005. La globalización productiva y comercial de la leche y sus derivados. *Articulación de la ganadería intensiva lechera de la Comarca Lagunera.* Plaza y Valdés editores, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, México. 278 p.
- García Guzmán, R. A., Román Bravo, R., Val Arreola, D., Pérez Sánchez, R. E., y Ortiz Rodríguez, R. 2013. Caracterización y modelación de la curva de lactancia de vacas Holstein complementadas con nopal (*Opuntia ficus-indica*) durante la época seca. *Revista Científica,* 23 (005).
- García, M. R. y Pérez, L. R. 2003. Fitoalexinas: Mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente, enero-junio, año/vol. 9, numero 001.* Universidad Autónoma de Chapingo. Mexico. pp.5-10.
- Granados, S. D, Castañeda P. A. D. 2000. El nopal. Historia, fisiología, genética, e importancia frutícola. Tercera reimpresión. México, D. F. Ed. Trillas. pp-5,11-13,72,75.

- Glazebrook, J. 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic And Necrotrophic Pathogens. Annual Review of Phytopathology, 43(1), 205-227.
- Gibson, C. A., Nobel, S. P. 1990. The cactus primer. First Harvard University Press paperback edition. p 196-199. <http://books.google.com.mx/books?id=B1NEgtRguQMC&pg=PA198&dq=cactus+mucilage&lr=&cd=2#v=onepage&q=cactus%20mucilage&f=false>.
- Gómez J. S., Vásquez G. 2011. "Aplicación de agentes antimicrobianos orgánicos en la inhibición de Salmonella spp en harinas de pescado exportación". Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador.
- Gonzales-Córdova AF, LM Torres and Vallejo CB (2004) Technification of the craft process to obtain mexican cheese. Center for research in nutrition and development, A. C. Coordination technology of food of Animal origin. Laboratory of chemistry and technology of dairy products. http://www.pncta.com.MX/pages/pncta_investigaciones_04g.asp?page=04e3 [Online] <http://wyndmoor.arserrc.gov/Page/D8000/8038-a>.
- Gutiérrez, E., Elías, A., Bernal H. y Morales H. 2008. Usos alternativos del nopal forrajero. Revista de salud pública veterinaria. VI simposium taller, producción y aprovechamiento del nopal en el noroeste de México. No. 14.
- Guzmán U., Arias S., P. Dávila 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, primera edición Pp. 174, 175, 181, 183,190, 192, 195.
- Guevara-Arauz, J.C., Ornelas-Paz, L.J., Pimentel-González, D.J., Mendoza, S.R., Soria, G.R.E., Paz, M.L.M.T. (2012) Prebiotic effect of mucilage and pectic-derived oligosaccharides from nopal (*Opuntia ficus-indica*). *F. Sci. Biotechnol.* 2012; **21**, 997-1003.
- Guevara A.J.C., 2009. Efectos biofuncionales del Nopal y la Tuna. Tecnología de Producción. Revista Horticultura 71:18-19 [en línea <http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rhi71/rhi71.pdf>]
- Gebremeskel, G., Getachew, A., Firew, T. 2013. Assessment of the potential of cactus pear (*Opuntia ficus indica*) as livestock feed in Northern Ethiopia. *Lives. Res. for Rur. Develop.* 25 (26).
- Heredia A (2003) Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim. Biophys. Acta* 1620:1-7.
- Holroyd G, A Hetherington, J Gray (2002) A role for the cuticular waxes in the environmental control of stomatal development. *New Phytol.* 153:433-439
- INEGI 2005. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA Y GEOGRAFIA, Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Jiquilpan, Michoacán de Ocampo.

- INEGI CP. 1999. La Ganadería Familiar en México. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, Colegio de Postgraduados, México.
- Jayarao BM, SC Donalson, BA Straley, AA Sawant, NV Hegde, JL Brown. 2006. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *J Dairy Sci* 89, 2451-2458.
- Jiménez, R.A., Alonso Pesado F., García Hernández L.A., Dávalos Flores G.L., Espinosa Ortiz y Ducoing Watty A. 2008. Persistencia de la lechería familiar en el municipio de Marabatio, Michoacán. 20(153). [*En línea*] From <http://www.lrrd.org/lrrd20110/jime/20.htm> (consulta 20/12/2014).
- Jeffree C E (2006) The fine structure of the plant cuticle. In: *Biology of the Plant Cuticle*. M Riederer, C Müller (eds). Julius-von-Sachs-Institut, für Biowissenschaften Universität Würzburg, Germany. pp:11-110.
- Jetter R, L Kunst, L Samuels (2006) Composition of plant cuticular waxes. In: *Biology of the Plant Cuticle*. M Riederer, C Müller (eds). Julius-von-Sachs-Institut, für Biowissenschaften Universität Würzburg, Germany. Pp. 145-175.
- Jensen GR. 1995. *Handbook of Milk Composition*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Kolattukudy P (1996) Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses. In: *Plant Cuticles*. G. Kerstiens (ed). Oxford: BIOS Scientific Publishers. pp:83-108.
- Kolattukudy P (2003) Natural waxes on fruits. *Postharvest Information Network*. <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/REP2003A.pdf>. (Consulta: Octubre 15, 2005).
- Kunst L, Samuels L (2009) Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:721-727.
- Knoche M, M Beyer, S Peschel, B Oparlakov, M Bukovac (2004) Changes in strain and deposition of cuticle in developing sweet Cherry fruit. *Physiol. Plant.* 120:667-677.
- Langenheim, J. H., 1994. Higher plants terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20: 1223-1280.
- Lach Z., Podkówka W., 2000. Wydajność i skład chemiczny mleka krów żywionych w systemie PMR [Yield and chemical composition of cow milk in PMR feeding system]. *Zesz. Nauk. Przegł. Hod.* 51, 109-118 [in Polish].
- Leide J, U Hildebrandt, G Vogg, M Riederer (2011) The positional sterile (ps) mutation affects cuticular transpiration and wax biosynthesis of tomato fruits. *J. Plant Physiol.* 168:871-877.
- Lozano L. 2011., *Ecofisiología de la tuna (Opuntia ficus-indica (L.) Mill.)*,. *Avances en Horticultura – Review.*, Universidad Nacional de Salta, Cátedra de Horticultura. Av. Bolivia 5150 (4400) Salta.

- López G. J. 2010. Uso Y Manejo Del Nopal Forrajero En El Noreste De México. IX Simposium-Taller Nacional y II Internacional "Producción y Aprovechamiento del Nopal y Maguey" Campus de Ciencias Agropecuarias, UANL. Escobedo, Nuevo León, México
- Minakowski D., 1993. Żywnienie krów a skład i jakość mleka [Cows feeding vs. composition and quality of milk]. *Przegl. Hod.* 4, 6-11 [in Polish].
- Macedo A, Gutiérrez E y Salas G 2006. Efecto de suplementación con bloques multinutricionales de melaza urea en vacas anéstricas en Carácuaro, Michoacán. *Livestock Research for Rural Development.* 18:11
- Matas A, J Cuartero, A Heredia (2004) Phase transitions in the biopolyester cutin isolated from tomato fruit cuticle. *Thermoch. Acta* 409:165-169
- Magariños H. 2000. Contaminación de la leche. En: Producción higiénica de la leche cruda. Una guía para la pequeña y mediana empresa. 1ª ed. Guatemala, Guatemala: Producción y Servicios Incorporados S.A. p 14-16
- Méndez G. S. de J. 2006. Principales usos y aprovechamiento del nopal en México. San Luis Potosí. http://oeidrus.zacatecas.gob.mx/oeidrus_zac/zacatecas/revista/VA4/Nopal3.htm.
- Medina, M.R., Tirado G.E., Mejía H. I., Camarillo S.I. y Cruz, V.C. 2006. Digestibilidad *in situ* de dietas con harina de nopal deshidratado conteniendo un preparado de enzimas fibrolíticas exógenas. *Pesq. Agropec. Bras, Brasília.* 41:7. 1173-1177.
- Molina, M.V.M. 2006. Caracterización de los sistemas de producción de ganado bovino en tierra caliente del estado de Michoacán. Tesis de maestría. División de estudios de posgrado de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia-UMSNH. Morelia, Michoacán. México.
- Moreno G. A. 2013. Efecto del nopal (*Opuntia-ficus-indica*) en la dieta de ganado lechero sobre la producción y calidad de leche cruda en la región ciénega de chapala (Doctoral dissertation).
- Morrissey, J. P., A. Osbourn, 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Reviews* 63: 708-724
- Mysore, K. S. and Ryu, C.-M. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*, 9(2), 97-104.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt Iii, B. F. and Dangl, J. L. 2003. Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, 37(1), 579-609.
- NMX-F-700-COFOCALEC-2004. Counting of somatic cells by flowcy to metry. [en línea]: www.cofocalec.org.mx/internaproductos.php
- NOM-110-SSA 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Secretaria de salud. México. Diario Oficial. Diciembre de 1995. [En línea] <http://201.147.97.103/work/sites/cfp/resources/LocalContent/1340/2/092ssa1.pdf>

- NOM-113-SSA 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Secretaria de salud. México. [En línea] <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>
- NOM-120-SS1-1994. Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994. Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Secretaria de salud. México [En línea] <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/093ssa14.html>
- NOM-121-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994. Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Secretaria de salud. México [En línea] www.salud.gob.mx/unidades/.../nom/121ssa14.html
- Ortega, P.R., Murillo, A.B., Espinoza, V.J.L., Palacios, E.A., Carreón, P.L., Palacios, M.E., and Plascencia, J.A. 2010. Chemical composition and proportion of precursors of ruminic and vaccenic acids in alternative forages for the feeding of ruminants in arid ecosystems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12: 33 – 45. Universidad Autónoma de Yucatán. México.
- Ortiz R.R., García G.R.A., Valdez A.J.J., Lara B.N. Pérez S.R.E. 2011. Estudio exploratorio del efecto de la adición de nopal (*Opuntia ficus-indica*) a la leche cruda sobre las cuentas bacterianas: *mesófilas* aerobias y *Coliformes totales*. Reuniones Nacionales de Investigación e Inocuidad Pecuaria, Agrícola, Forestal y Acuícola Pesquera. Leon Guanajuato. Octubre 2011.
- Ortiz-Rodríguez R., Valdez-Alarcón J. J., Garcidueñas-Piña R., Chávez-Moctezuma M. P., Val-Arreola D., Hernandez Valdes E. F. and Pérez-Sánchez R. E. 2013. Effect of added nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) on microbial content in raw milk. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 7(28), pp. 3675-3680, 12 July, 2013 DOI: 10.5897/AJMR2013.5389 ISSN 1996-0808 ©2013 Academic Journals.
- Orrego J, Delgado A, Echevarría L. 2003. Vida productiva y principales causas de descarte de vacas lecheras Holstein en la cuenca de Lima. *Rev Inv Vet, Perú* 14(1): 68-73.
- Paul BJ (2005) Ejemplo de un medicamento probiótico: *Saccharomyces boulardii* liofilizada. *REV. GASTROENTEROL. PERÚ*. 25: 176188.
- Rodríguez L J. (2008). Urge aumentar la producción e ingresos de ganaderos: diputados. [en línea] <http://www.lajornadamichoacan.com.mx/2008/11/10/index.php?section=politica&article=006n1pol>
- Rodríguez G.S. 2010. "Efecto de la incorporación de mucílago de nopal sobre las propiedades sensoriales y texturales de una pasta a base de huitlacoche *Ustilago maydis*" Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología-UMSNH. Morelia, Michoacán.
- Revels, H.M., Flores, O. M., Blanco, M. F. y Valdez, C. R. 2010. El Manejo Del Nopal Forrajero En La Producción Del Ganado Bovino. VIII Simposium-Taller Nacional y 1er Internacional

"Producción y Aprovechamiento del Nopal". RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial No. 5. ISSN 1870-0160

- Reza N. S., Flores E. A. L., Alonso N. M y Ramírez B. P.2005. Evaluación de Textura, Color y Aceptación del Nopalito variedad Milpa alta Escaldado, a Diferentes Tiempos de Inmersión en Solución de NaCl y CaCl₂, y Empacado a Vacío. CNA-14.Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Durango, Dgo. P-146 <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2005/ee-13-2005/index.html>.
- Ríos, R. J. y Quintana, V. M., 2004. Manejo general del cultivo del nopal. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Colegio de posgraduados. P 81.
- Ruiz, H. F., Guerrero, B. J. A. 2009. Aplicación de las películas comestibles a base de quimostato y mucílago de nopal en fresa (*Fragaria ananasa*) en refrigeración. Tesis de maestría. Ciencia en alimentos. Universidad de las Américas Puebla. Puebla. P-21-23.
- Reina-Pinto J J, A Yephremov (2009) Surface lipids and plant defenses. Plant Physiol. Biochem. 47:540-549. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mca/ruiz_h_f/capitulo3.pdf.
- Riederer M (2006) Introduction: biology of the plant cuticle: In: Biology of the Plant Cuticle. M Riederer, C Müller (eds). Julius-vonSachs-Institut, für Biowissenschaften Universität Würzburg, Germany. pp:1-8.
- Rogiers S, J Hatfield, V Gunta, R White, M Keller (2004) Grape berry cv. Shiraz epicuticular wax and transpiration during ripening and preharvest weight loss. Amer. J. Enol. Vitic. 55:121127.
- Paredes, L. O. Guevara, L. F. Bello, P. L.A. 2006. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. Primera edición. Ed. fondo de cultura económica. México, D.F. pp 104-106.
- Paul BJ (2005) Ejemplo de un medicamento probiótico: *Saccharomyces boulardii* liofilizada. REV. GASTROENTEROL. PERÚ. 25: 176- 188.
- Ruiz, H. F., Guerrero, B. J. A. 2009. Aplicación de las películas comestibles a base de quimostato y mucílago de nopal en fresa (*Fragaria ananasa*) en refrigeración. Tesis de maestría. Ciencia en alimentos. Universidad de las Américas Puebla. Puebla. P-21-23. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mca/ruiz_h_f/capitulo3.pdf.
- Sánchez, R.G Y A. Sánchez V., 2005. La ganadería bovina del estado de Michoacán. Fundación PRODUCE Michoacán, A.C. primera edición. Pp. 1, 43,69-75
- Santos, H. A., Vázquez, A. R. E., Ornelas, E. G., y Treviño, H. M. 2010. Evaluación de la productividad y caracterización de tres variedades de nopal mejorado y tres criollos. VIII Simposium-Taller Nacional y 1er Internacional "Producción y Aprovechamiento del Nopal". RESPYN edición especial no. 5-201 (ISSN 1870-0160).

- Sáenz, C., Berger, H., Corrales, G. J., Galletti, L., García, C. V., Higuera, I., Mondragón, C., Rodríguez, A. F., Sepúlveda, E., Vanero, M. T. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. Reimpresión. Boletín de servicios de la FAO. Roma, Italia. 13 pp.
- Samuels L, L Kunst, R Jetter (2008) Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:683707.
- SAGARPA.2000. Situación actual y perspectivas de la producción de leche de ganado bovino en México. 1900-2000. Dirección general de ganadería. [En línea] www.sagarpa.gob.mx (consulta 15/12/2014)
- SAGARPA (2004) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de ganado bovino en México 1990-2000. <http://www.sagarpa.gob.mx> consultado en junio 2004.
- SAS/STAT (2000) Guide for personal computers. Version 9.1. Statistical Analysis System (SAS) Institute In Compani.Cary electronic version available on CD.
- Shepherd T, D W Griffiths (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol.* 171:469-499.
- Stark R, S Tian. (2006) The cutin biopolymer matrix: In: *Biology of the Plant Cuticle*. M Riederer, C Müller (eds). Julius-von-SachsInstitut, für Biowissenschaften Universität Würzburg, Germany. pp:126-141.
- Sumano S. L.H., Ocampo C. L. 2006. *Farmacobiología Veterinaria.*, Tercera Edicion, Editorial Mac Graw Hill. Mexico.Pp 235.
- Schreiber L (2005). Polar paths of diffusion across plat cuticles: new evidence for an old hypothesis. *Ann. Bot.* 95:1069-1073
- Thatcher, L. F., Anderson, J.P. and Singh, K.B. 2005. Plant defence responses: what have we learnt from Arabidopsis? *Functional Plant Biology*, 32(1), 1-19.
- Torres S. A. 2010. Composición química del nopal y sus implicaciones en la nutrición de rumiantes (experiencias de Brasil). *Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial*, 5, 143-151
- Vázquez V. G. K., 2007., Estudio del efecto de la reducción de la actividad del agua, pH y adición de ácidos Orgánicos en el crecimiento de *Escherichia coli* en filetes de res almacenados a temperatura ambiente. Tesis de grado en Ingeniería de los alimentos. Guayaquil Ecuador. Pp 14-18.
- Vásquez, A., R.E., R.D. Valdez C., E. Gutiérrez O. y F. Blanco M. 2007. Caracterización e identificación del nopal forrajero en el norte de México. *Memorias del VI simposium taller producción y aprovechamiento del nopal en el noroeste de México.* 7 y 8 de Diciembre del 2007. Marin, N.L. México.

- Verpoorte, R., 2000. Secondary metabolism. In: Verpoorte, R. and Alfermann, A. W. (eds.). Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Kluwer Academic Publishers. Dredrecht. pp. 1-29.
- Verardo G, E Pagani, P Geatti, P Martinuzzi (2003) A thorough study of the surface wax of apple fruits. *Analyt. Bioanaly. Chem.* 376: 659-667.
- Veraverbeke E, P Van, I Decastro, B Nicolai (2001) Analysis of apple (*Malus domestica* borkh.) wax by means of chromatographic techniques and confocal microscopy. *Acta Hort.* 553:519-522.
- Veraverbeke E, P Verboven, P Van, B Nicolai (2003) Prediction of moisture loss across the cuticle of apple (*Malus sylvestri* subsp. *Mitis* (Wallr)) during storage. Part 1. Model development and determination of diffusion coefficients. *Postharv. Biol. Technol.* 30:75-88.
- Vogg G, S Fischer, J L, E Emmanuel, R Jetter, A Levy, M Riederer (2004) Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-CoA synthase. *J. Exp. Bot.* 55:1401-1410.
- V. K. Bajpai, A. Rahman, N. T. Dung, M. K. Huh, and S. C. Kang, "In vitro inhibition of food spoilage and foodborne pathogenic bacteria by essential oil and leaf extracts of *Magnolia liliflora* Desr.," *Journal of Food Science*, vol. 73, no. 6, pp. M314–M320, 2008.
- Wanderley, W. L. 2001. Palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) na ração de vacas holandesas em lactação. Recife: UFRPE. Tese Mestrado. 41 p.
- Wagner P, R Fürstner, W Barthlott, C Neinhuis (2003) Quantitative assessment to the structural basis of water repellency in natural and technical surfaces. *J. Exp. Bot.* 54:1-9.
- Wiermer, M., Feys, B.J. and Parker, J.E. 2005. Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4): 383-389.
- Yeats TH, G J Buda, Z Wang, N Chehanovsky, L C Moyle, R Jetter, A A Schaffer, J K C Rose (2012) The fruit cuticles of wild tomato species exhibit architectural and chemical diversity, providing a new model for studying the evolution of cuticle function. *Plant J.* 69:655-666.
- Yeats T H, K J Howe, A J Matas, G J Buda, T W Thannhauser, J K C Rose (2010) Mining the surface proteome of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit for proteins associated with cuticle biogenesis. *J. Exp. Bot.* 61:3759-3771.