

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD



TESIS

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS RESISTENTES A  
ANTIBIÓTICOS MEDIANTE EL USO DE BACTERIOCINAS  
GENERADAS POR BACTERIAS GRAM POSITIVAS AISLADAS DE  
QUESOS ARTESANALES.

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

IBQ. ANA ZULEMA SALAZAR SALAZAR

Directora de Tesis  
Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala

Co-Directora  
Dra. María Eugenia Pérez Morales.

Tijuana, Baja California; Junio de 2017

**Antecedentes:** Patógenos resistentes a antibióticos representan un serio problema de salud pública que estimulan la búsqueda de nuevas alternativas antibióticas. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos ampliamente distribuidos y de gran utilidad en la industria alimentaria, además de su capacidad para producir compuestos antimicrobianos.

**Objetivo:** Evaluar el efecto de inhibición de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas sobre microorganismos patógenos de interés clínico resistentes a antibióticos mediante técnicas de concentración mínima inhibitoria, para proponer su uso en el tratamiento de cepas patógenas resistentes a antibióticos.

**Metodología:** Estudio analítico transversal realizado en muestras de quesos artesanales obtenidos de la zona Tecate-Ensenada conocida como la Ruta del Vino para probar la inhibición del crecimiento de bacterias de interés clínico resistentes a antibióticos mediante el uso de bacteriocinas generadas por bacterias ácido lácticas aisladas de quesos. Las muestras se sometieron a un análisis para determinar la actividad de inhibición frente a patógenos resistentes a antibióticos a través de diferentes pruebas de susceptibilidad para probar la producción de compuestos inhibidores tipo bacteriocinas.

**Resultados:** Se detectó la capacidad de producción potencial de bacteriocinas de 3 aislamientos provenientes de quesos frescos, identificados por perfil bioquímico y molecular como *Lactococcus lactis*. El ensayo de inhibición a través del método *spot on lawn* reportó mejores resultados (halos de inhibición de 10 a 30 mm) y actividad de las bacteriocinas parcialmente purificadas sobre *S. aureus* y *E. coli* resistente fue de 20,000 AU/mL pero no se reportó actividad sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Se identificaron aislamientos de enterobacterias (*Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *E. coli*).

**Conclusiones:** Se demostró la capacidad para producir compuestos inhibidores tipo bacteriocinas a partir de 3 aislamientos de *Lactococcus lactis* provenientes de quesos frescos artesanales, con capacidad de inhibir patógenos resistentes a antibióticos, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y

*Escherichia coli* betalactamasa de espectro prolongado pero sin actividad sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

**Palabras clave:** Quesos artesanales, bacteriocinas, bacterias ácido lácticas, bacterias resistentes a antibióticos.

## ABSTRACT

---

**Background:** Antibiotic-resistant pathogens are a serious public health problem that stimulates the search for new antibiotic alternatives. The lactic acid bacteria (BAL) are a group of microorganisms widely distributed and very useful in the food industry, in addition to their ability to produce antimicrobial compounds

**Objective:** Evaluate the effect of inhibition of bacteriocins produced by lactic acid bacteria on clinical interest pathogenic microorganisms resistant to antibiotics by minimum inhibitory concentration techniques, to propose its use in the treatment of pathogenic strains resistant to antibiotics.

**Methodology:** A cross-sectional analytical study in samples of artisan cheeses obtained from the Tecate-Ensenada area known as the “Wine Route” to test the inhibition of the growth of clinical interest bacteria resistant to antibiotics through the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from cheese. The samples were submitted to an analysis to determine the inhibition activity against pathogens resistant to antibiotics through different susceptibility tests to test the production of compounds inhibitors type bacteriocins.

**Results:** It detected the potential production of bacteriocins of 3 isolates from fresh cheeses, identified by biochemical and molecular profile like *Lactococcus lactis*. The test of inhibition through the *spot on lawn* reported better results (halos of inhibition of 10 to 30 mm) and activity of the bacteriocins partially purified on *S. aureus* and *E. coli* resistant was 20,000 AU/mL but not reported activity on *Pseudomonas aeruginosa*. *Enterobacteriaceae* isolates were identified (*Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *E. coli*).

**Conclusions:** It demonstrated the ability to produce bacteriocins type inhibitors compounds from 3 strains of *Lactococcus lactis* from fresh artisan cheeses, with the capacity of inhibiting pathogens resistant to antibiotics, such as methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Escherichia coli* of extended spectrum but no activity on *Pseudomonas aeruginosa*.

**Key words:** Artisan cheeses, bacteriocins, lactic acid bacteria, bacteria resistant to antibiotics

## AGRADECIMIENTOS

---

**A Dios:** Por darme la oportunidad de concluir una etapa más en mi formación profesional, por brindarme una vida llena de aprendizajes y siempre darme fuerzas para continuar.

**A mis padres, Paty y Chilo:** Por escucharme siempre, por ser mi fortaleza y motivación en momentos de debilidad, por ser mi ejemplo de vida y sobre todo por su amor incondicional.

**A mis hermanos:** Por ser parte importante en mi vida y representar la unidad familiar.

**A mi esposo, Víctor:** Por escucharme con paciencia, por su apoyo, comprensión y amor que siempre me ha demostrado.

**A mi directora de tesis, Dra. Lily Hurtado:** Gracias de corazón por sus enseñanzas, paciencia y disposición. Por su singular personalidad, por la alegría que contagia y el haberme aceptado aún sin conocerme, por sus consejos, criterio y aliento, me llevo mucho de usted.

**A mi co-directora, Dra. María Eugenia:** Gracias por ser mi guía durante esta experiencia, por su apoyo, paciencia y contribuciones a enriquecer el proyecto.

**A la Dra. Bertha Landeros:** Por su confianza, apoyo y experiencia compartida durante la realización de este proyecto.

**Al Mtro. Luis Alcántara:** Gracias por su paciencia, por el tiempo dedicado, por sus consejos y su gran apoyo durante esta etapa.

**A la Dra. Mirna Brito:** Por su apoyo y contribuciones durante la realización de este proyecto.

A los miembros del **laboratorio de microbiología**, en especial a Andrhith por su apoyo durante la parte experimental y por hacer las horas de laboratorio cortas.

A mis compañeros de maestría por su compañerismo y apoyo.

**A la Universidad Autónoma de Baja California**, por ser mi segunda alma mater.

**A CONACYT** por el apoyo económico para la realización de este proyecto y la oportunidad de estudiar la maestría.

## CONTENIDO

---

ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	11
INTRODUCCIÓN.....	11
I. ANTECEDENTES.....	12
Producción de queso.....	13
Quesos artesanales. ....	15
Variedades de queso. ....	16
Adaptado de NOM-121-SSA. ....	19
Microbiología del queso. ....	19
Bacterias ácido lácticas (BAL).....	20
Producción de bacteriocinas por BAL.....	21
Clasificación de bacteriocinas. ....	22
Biosíntesis de bacteriocinas y modo de acción. ....	24
Resistencia a antibióticos. ....	27
Utilidad de las bacteriocinas frente a la inhibición de patógenos. ....	30
Métodos de purificación y detección de bacteriocinas. ....	32
II. JUSTIFICACIÓN .....	42
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	45
IV. OBJETIVO GENERAL .....	48
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
VI. HIPOTESIS.....	50
VII. METODOLOGÍA .....	51
VIII. PROCEDIMIENTO .....	53
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
X. CONCLUSIONES.....	78
XI. RECOMENDACIONES .....	80
XII. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	81
XIII. BIBLIOGRAFÍA .....	82
XIV. ANEXOS.....	92
ANEXO 1. Diagramas de flujo de análisis de muestras. ....	92

ANEXO 2. Estandarización del método de identificación.....	93
ANEXO 3. Análisis estadístico de resultados. ....	99

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Diez variedades de queso natural	16
2	Cuatro grandes grupos de quesos.	17
3	Clasificación de los quesos de acuerdo a su contenido de humedad.	17
4	Variedades de quesos frescos y madurados.	18
5	Clasificación de los quesos de acuerdo a la NOM-121-SSA1.1994.	19
6	Clasificación de bacteriocinas de acuerdo a sus características físicas y químicas.	23
7	Diseño de toma de muestras en la Ruta del Vino	54
8	Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias aisladas a partir de quesos.	56
9	Revisión de artículos para selección de <i>primers</i> .	57
10	Distribución del muestreo realizado en la Ruta del Vino (variedades y número de muestras).	61
11	Resultados de pH de las muestras de queso para su análisis.	62
12	Selección de cepas productoras de sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas.	63
13	Identificación bioquímica de aislamientos productores de sustancias BLIS.	64
14	Aislamientos de enterobacterias en muestras de queso.	65
15	Análisis de halos de inhibición (mm) reportados por <i>L. lactis</i> , <i>L. delbrueckii</i> y <i>B. sporogenes</i> frente a bacterias patógenas.	67
16	Cantidades para preparación de reacción de PCR	69
17	Halos de inhibición reportados por las 3 cepas de <i>Lactococcus lactis</i> .	71
18	Estandarización de la curva patrón utilizando albúmina como proteína de referencia.	74
19	Cuantificación de proteínas utilizando método Bradford.	75
20	Actividad de las bacteriocinas parcialmente purificadas.	77
21	Condiciones para recuperación de <i>L. delbrueckii</i>	93
22	Resultados de crecimiento de <i>L. delbrueckii</i> en diferentes condiciones.	94
23	Absorbancia inicial a diferentes pH cultivo en caldo MRS <i>L. delbrueckii</i> .	95
24	Absorbancia final (24hrs) a diferentes pH cultivo en caldo MRS. <i>L. delbrueckii</i> .	95
25	Diferencia de absorbancia a diferentes pH. <i>L. delbrueckii</i> .	95
26	Resultados de pruebas de observación microscópica.	97



## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura	Descripción	Página
1	Etapas de elaboración del queso.	12
2	Campana de flujo laminar del laboratorio de análisis microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.	54
3	Incubadora del laboratorio de análisis microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.	55
4	Termociclador GS1 para efectuar reacción de PCR.	58
5	Aislamientos de bacterias productoras potenciales de sustancias tipo bacteriocinas.	63
6	Identificación molecular del género.	69
7	Identificación molecular de especie.	70
8	Perfiles de proteínas.	72

---

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

---

Gráfica	Descripción	Página
1	Cuantificación de proteínas por método Bradford.	75
2	Absorbancia registrada a diferentes rangos de pH de los cultivos.	96
3	Lectura de absorbancia a diferentes rangos de longitud de onda.	96

## INTRODUCCIÓN

---

En los últimos años se ha observado un creciente interés desde el punto de vista científico y social por el empleo de sustancias que involucren efectos positivos en la salud, tal es el caso del papel que desempeñan los alimentos probióticos en el mantenimiento de la salud y en la prevención y tratamiento de enfermedades.

El concepto probiótico cada vez adquiere mayor rango de conceptualizaciones cambiado a lo largo de los años, volviéndose más amplio y menos preciso. La definición más aceptada involucra el empleo de microorganismos o sus metabolitos, que al ser ingeridos producen un efecto positivo en la salud del individuo.

Existe una larga lista de microorganismos utilizados como probióticos pero dentro de los principales, figuran las bacterias ácido lácticas. Las bacterias ácido lácticas (BAL), constituyen un diverso grupo de microorganismos caracterizados por su capacidad fermentativa. Aunque no menos importante su capacidad para producir compuestos peptídicos con actividad antagonica frente a otras bacterias, pero inocuos para el consumo humano. Los lactobacilos han mostrado capacidad de producir sustancias adhesivas antipatógenos, cuyo efecto inhibitorio puede extenderse a un amplio rango de patógenos.

En la actualidad, uno de los desafíos que se presentan en el área de la Microbiología, es la búsqueda de alternativas al uso de los antibióticos mediante sustancias naturales que disminuyan las infecciones que se presentan causadas por microorganismos. Aunado a lo anterior se encuentra el problema del aumento de microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos convencionales, lo cual requiere el uso de terapias antimicrobianas alternativas, donde el uso de bacteriocinas generadas por BAL podría proveer parte de la solución.

## I. ANTECEDENTES

---

El queso es definido como la fracción sólida de alto valor alimenticio por su contenido de proteínas, grasa, calcio y fósforo, que se obtiene por el secado del suero después de la coagulación de la caseína (proteína de la leche), por la producción de ácidos por microorganismos, por enzimas o por la adición de acidulantes; lo que conduce a la formación de la *cuajada*; su fabricación se produjo de forma accidental al observar la coagulación de la leche cuando se utilizaban estómagos de ganado para el transporte de la misma (Planzer *et al.*, 2009 y Hernández, 2003).

La producción de quesos se inicia con operaciones que desencadenen en la formación de un coágulo o cuajada; las propiedades iniciales del coágulo cambian bajo condiciones de maduración (salado, temperatura, humedad), lo que también contribuye al desarrollo de microorganismos y la acción de sus enzimas (García, Quintero y López-Munguía, 2004). Los pasos fundamentales en la elaboración de quesos incluyen la coagulación de la leche, cortado del coágulo, eliminación del suero, salado, prensado y maduración, si se requiere (Figura 1) (Benavides, 2010).

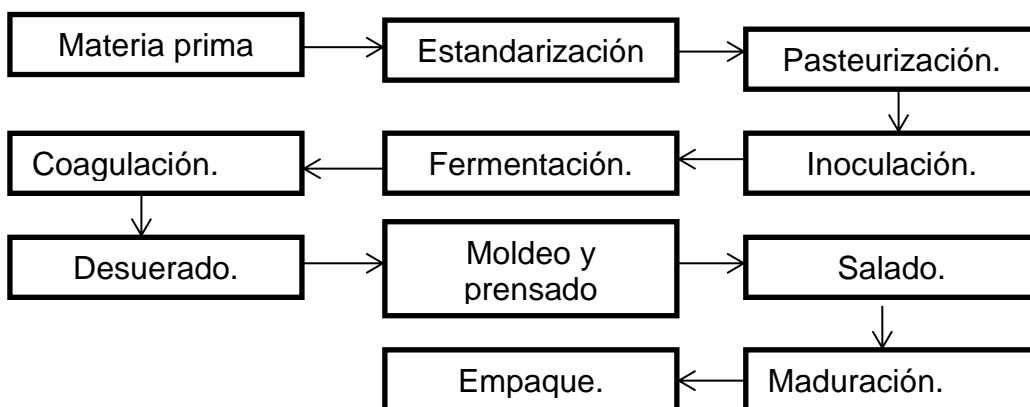


Figura 1. Etapas de elaboración del queso (Hernández, 2003, FAO, 2017, García, Quintero y López-Munguía, 2004).

La variación en las características organolépticas en los quesos están relacionadas con el tipo y calidad de leche utilizada, enzimas, microorganismos,

acidez, condiciones de maduración (temperatura, humedad, etc.), concentración de grasa y de proteínas (Badui, 2006).

### **Producción de queso.**

El queso es el producto lácteo más importante y representa el 34% del total de los productos lácteos elaborados. Entre los mayores productores figuran Japón, Estados Unidos, Arabia Saudita, Rusia y Brasil, siendo este último el tercer mayor productor de queso en el mundo, seguido de la Unión Europea y Estados Unidos, la cuarta parte de la producción corresponde a América del Norte; el mercado de exportaciones se concentra en los continentes de la Unión Europea y Oceanía responsables del 80% de éstas (Food and Agriculture Organization, FAO, 2014; Planzer *et al.*, 2009 y PROFECO, 2000).

El consumo de queso experimenta notables variaciones de acuerdo a las demandas de los distintos mercados, en Francia e Italia se consume el 88% de queso como ingrediente industrial o a través de un servicio gastronómico y el 10% restante a través de venta al menudeo, contrario a lo que sucede en Alemania, donde las ventas minoristas alcanzan un 30% (Quezada, 2013). En cuanto a Latinoamérica, el consumo de queso per cápita en Argentina se calcula de 12 kg y en Uruguay alrededor de 10 kg, poco más que el consumo per cápita del resto de los países latinoamericanos, lo que muestra un gran margen de crecimiento en el consumo de queso (Esnaola, 2013).

Uruguay es el país con más expectativa de crecimiento en el sector lácteo de acuerdo con la FAO y se estima un aumento relativo del 42% de la producción hasta el 2018. De acuerdo con la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ONEPA), en Chile la elaboración de quesos va en aumento, alcanzando cifras de alrededor de 26,000 toneladas, de los cuales el queso fresco, la principal variedad, supera las 12,500 toneladas. Un análisis del 2012 muestra que del volumen de recepción de leche, menos del 40% (839 millones de litros) se destinó a la elaboración de leche pasteurizada, mientras que alrededor de un 41%,

correspondientes a 868 millones de litros, se destinó a la elaboración de quesos (Esnaola, 2013).

El queso panela y el doble crema duplicaron su producción hasta el 2008, evidenciándose el dominio en la producción de quesos frescos en México, lo que se sustenta con las importaciones de queso fresco, las cuales pasaron de 975 toneladas en 1997 a 15,677 en 2008 (Villegas de Gante y Cervantes, 2011).

Hasta el trimestre abril-junio de 2015 la industria de quesos en México produjo 144, 606 toneladas de queso con un valor en el mercado de 6 mil 464 millones de pesos, siendo las principales variedades de quesos: panela, fresco y chihuahua con un porcentaje de 17, 16 y 16%, respectivamente (SIAP, 2016).

Una gran variedad de empresas en el campo de producción de quesos han aumentado su producción de lácteos dado el aumento considerable de su consumo como *Cathedral City* en el Reino Unido, *Mainland* en Australia y América, *Karry Foods* en Francia y *Dongwon Dairy* en Corea del Sur. En cuanto al consumo de lácteos, Estados Unidos y Europa figuran como los mayores mercados en consumo de queso, aunque la industria se enfoca en los mercados emergentes en Asia y América Latina, en los cuales se ha estimado un crecimiento durante el periodo de 2006 a 2015 (Quezada, 2013).

En México las empresas queseras más importantes se ubican en el norte y en los estados de Jalisco y Guanajuato, donde la producción se centra en las variedades de quesos duros y semiduros, sin dejar de citar que la mayoría de las queserías mexicanas involucran la producción de quesos frescos, por ser los más consumidos, además de presentar menores dificultades en su proceso de elaboración aunado a una mayor rentabilidad (Pomeón y Cervantes, 2010).

En México existen unidades de producción de queso con procesos tecnológicos básicos, tratándose de prácticas mayormente artesanales, definiéndola como una agroindustria tradicional. Oficialmente se tiene registrada la existencia de aproximadamente 1500 queserías (INEGI, 2008), donde las regiones que tienen

mayor participación en el sector productor de quesos se encuentran en los estados de Hidalgo, Michoacán, Puebla, Chiapas y Chihuahua (INEGI, 2008).

### **Quesos artesanales.**

Los criterios históricos vinculados a la tecnología en la producción de quesos, forma, tamaño o denominación han permitido definir a los quesos como tradicionales haciendo referencia a la quesería artesanal como garantía de su autenticidad (Froc, 2006).

El queso artesanal es un producto fermentado típico elaborado de forma manual y con el uso de herramientas tradicionales (la fermentación es espontánea, el corte de la cuajada en granos pequeños se realiza en forma manual, el salado en la masa es mínimo y el prensado es también manual), que se obtiene, en la mayoría de los casos, a partir de leche cruda y el uso de cuajos artesanales sin la adición de cultivos iniciadores, cuya calidad está influenciada fuertemente por el área geográfica de producción y sus tradiciones, debido a que la higiene de la leche y los derivados que se obtienen dependen de los hábitos y procedimientos productivos. La microbiota autóctona contenida en los quesos, el tipo de leche cruda seleccionada, el medio ambiente y la tecnología de elaboración de quesos, podrían considerarse algunos de los principales factores en la determinación de las características típicas del queso (Martínez, Montes y Villoch, 2016 y Hermanns *et al.*, 2014).

Los quesos producidos localmente de manera artesanal han ganado aceptación, provocando un incremento en las ventas como es el caso de Argentina, donde los quesos con denominación de origen como el queso Goya, Pategrás, Holanda o Mar de Plata se han abierto campo en un sector relativamente reducido (Quezada, 2013).

La producción de quesos frescos artesanales constituye una de las principales formas de ingresos y tradición para el sector cooperativo y campesino de muchos países de Latinoamérica; siendo el queso fresco la forma de consumo de aproximadamente el 87% de los lácteos producidos en Centroamérica y el más

consumido en México, estos quesos no son madurados y se consumen solamente sazonados o salados con especias (Badui, 2006).

En México hay una amplia variedad de quesos artesanales con potencial de comercialización en nivel regional, nacional e incluso algunas marcas de exportación con certificación de calidad. Se estima la existencia de 1,300 empresas en México que manufacturan cerca de 32 variedades de queso y otros productos lácteos de manera artesanal (Vazquez-Fontes *et al.*, 2010).

### **Variedades de queso.**

Existen alrededor de 2,000 variedades de quesos en el mundo y unas 400 clases pero solo 10 tipos diferentes de queso natural basado en el proceso de obtención (Tabla 1); sin embargo es posible clasificarlos en cuatro grandes grupos (Tabla 2) de forma general, aunque también pueden ser clasificados de acuerdo al animal del cual proviene la leche, composición química, proceso de maduración o sabor del queso (Revilla, 1982).

Tabla 1. Diez variedades de queso natural

Variedad de queso	Proceso distintivo	Característica distintiva
Crema, Cabaña	Coagulación principal por ácido	Cuajada blanda
Cheddar, Cheshire	Cuajada compacta	Textura firme
Monterrey, Gouda	Cuajada separada	Textura abierta
Parmesano, Romano	Presencia de cobre	Textura granular
Provolone, Mozzarella	Cuajada estirada	Textura plástica
Suizo, Gruyere	Maduración bacteriana con formación de ojos	Agujeros de gas
Roquefort, Azul	Moho visible	Maduración por mohos
Camembert, Brie	Superficie cubierta por mohos	Interior cremoso
Limburger, Bel paese	Superficie cubierta por bacterias y levaduras	Suave, cremoso
Ricotta, Primost	Proteína del suero coagulada por ácido y calor	Sabor dulce

Revilla (1982). Tecnología de la leche.

Tabla 2. Cuatro grandes grupos de quesos.

Grupo	Característica distintiva	Variedad de queso
Muy duro	a. Madurado por bacteria	Parmesano, Romano
Duro	a. Madurado por bacterias, sin ojos	Cheddar, Cheshire
	b. Madurado por bacterias, con ojos	Suizo, Gruyere
Semiblando	a. Parcialmente madurado por bacterias	Brick, Münster
	b. Madurado por bacterias y superficie cubierta de microorganismos	Limburger
	c. Parcialmente madurado por moho.	Roquefort, Azul.
Blando	a. Madurado	Camembert
	b. Sin madurar	Crema, Ricotta, Fresco, requesón.

Revilla (1982). Tecnología de la leche.

Otra clasificación refiere a la textura de los quesos, clasificándolos en duros o de pastas duras, semiduras y suaves o de pasta blanda; en los cuales la dureza depende principalmente de su contenido de agua, oscilando entre un 13 a 34% para quesos duros y hasta un 60% para quesos suaves (Hernández, 2003).

Tabla 3. Clasificación de los quesos de acuerdo a su contenido de humedad.

Tipo	Humedad (%)	Grasa (%)	Textura	Conservación
Suave	45 a 75	Hasta 40	Suave, fácil de untar	Unos días
Semiduro	35 a 45	Hasta 35	Firme a desmenuzable, puede cortarse en rodajas	Unos meses
Duro	30-40	Hasta 30	Muy firme, denso, algunas veces grumoso	Un año o más

Fondo de Naciones Unidas para el Crecimiento de la Mujer (UNIFEM), 1998.

Las diferencias principales estriban en relación a la textura, aroma, sabor, lugar de fabricación, proceso de elaboración, presentación, método de almacenamiento, entre otros (Del Castillo y Mestres, 2004).

La clasificación más general de las distintas variedades de quesos se basa en si los quesos han sido sometidos a un proceso de fermentación (maduración) con microorganismos o no la incluyen; en esta clasificación, se denominan quesos madurados y quesos frescos (Tabla 4) (Hernández, 2003).

Tabla 4. Variedades de quesos frescos y madurados.

Quesos madurados	Quesos Frescos
Parmesano	Queso crema
Cheddar	Ricotta
Suizo	Requesón
Gruyere	Tierno
Roquefort	
Camembert	
Petit Suisse	

Hernández (2003).

Dada la amplia variedad de quesos, las distintas denominaciones, lugares de elaboración, formas y procesos de elaboración se torna difícil clasificar a todos los quesos, por ello se definen clasificaciones generales. Battro (2010) incluye en su clasificación quesos frescos sin corteza, con corteza natural, semiduros y duros, con maduración secundaria (azules, con hongos en la superficie, de cáscara elevada), cheddarizados y los de pasta hilada.

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: Frescos, Madurados y Procesados. Especificaciones Sanitarias; los productos objeto de la norma se clasifican en: Frescos, Madurados y Procesados (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación de los quesos de acuerdo a la NOM-121-SSA1.1994.

Frescos	Madurados	Procesados
<p><b>Frescales:</b> Panela, canasto, Sierra, Ranchero, Fresco, Blanco, Enchilado, Adobado.</p> <p><b>De pasta cocida:</b> Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Del Morral, Adobera.</p> <p><b>Acidificados:</b> Cottage, Crema, Doble crema, Petit Suisse, Nuefchatel.</p>	<p><b>Madurados prensados de pasta dura:</b> Añejo, Parmesano, Cotija, Reggianito.</p> <p><b>Madurados prensados:</b> Cheddar, Chester, Chihuahua, Manchego, Brick, Edam, Gouda, Gruyere, Emmental, Cheshire, Holandés, Amsterdam, Butterkase, Coulomiers, Dambo, Erom, Friese, Fynbo, Havarti, Harzer-Kase, Herrgardsost, Huskallsost, Leidse, Maribo, Norvergia, Provolone, Port Salut, Romadur, Saint Paulin, Samsøe, Svecia, Tilsiter, Bola, Jack.</p> <p><b>De maduración con mohos:</b> Azul, Cabrales, Camembert, Roquefort, Danablu, Limburgo, Brie.</p>	<p><b>Fundidos</b></p> <p><b>Fundidos para untar.</b></p>

Adaptado de NOM-121-SSA.

### Microbiología del queso.

El queso contiene elevada carga microbiana, que resulta importante durante los procesos de maduración. La microflora del queso es dividida en dos grupos: Flora ácido láctica y flora secundaria. La primera incluye a los cultivos iniciadores para la coagulación del queso y formación de la cuajada y la segunda incluye bacterias ácido lácticas distintas a los cultivos iniciadores, así como bacterias, hongos y levaduras responsables de las características organolépticas distintivas del queso y la descomposición de los mismos (Beresford *et al.*, 2001).

Varios estudios han reportado la incidencia de patógenos como *E. coli enteropatogénica* (EPEC), *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis* de muestras de quesos. *Listeria monocytogenes* también se ha aislado de muestras en proceso y el entorno de producción (Planzer *et al.*, 2009; Gasparin, Hanada y Yoshiteru, 2005).

Además de las especies patógenas en la microflora del queso también existen bacterias ácido lácticas que muestran características probióticas, disponibles para colonizar el tracto intestinal y promover el balance de la microbiota en este ambiente (Hermanns *et al.*, 2014).

### **Bacterias ácido lácticas (BAL).**

Las bacterias ácido lácticas conforman un grupo de microorganismos de mayor importancia en la industria, sobre todo en la alimentaria, son importantes iniciadores de reacciones, como maduración y transformaciones primarias y se encuentran en una gran variedad de productos fermentados (Parra, 2010). Las BAL son ampliamente distribuidas en la naturaleza, se encuentran comúnmente en vegetales, granos, leche y en carne fresca, participan en fermentaciones de alimentos donde son los microorganismos dominantes, resultando en la acidificación e inhibición de bacterias patógenas por competencia (D'Angelis *et al.*, 2008).

Las bacterias lácticas son microorganismos que comparten como características el ser Gram positivos, generalmente inmóviles, no esporulados, no pigmentados, no reductores de nitratos. Tampoco licúan la gelatina y no producen indol ni ácido sulfhídrico. Son anaerobios aerotolerantes, carecen de catalasa, peroxidasa positivos y productores de superóxido dismutasas; además cuentan con factores de exigencia nutricionales y de crecimiento complejos, la característica representativa se encuentra asociada a la producción de ácido láctico resultado de su metabolismo fermentativo (Martínez, 1996).

Las BAL agrupan diferentes microorganismos que comparten características metabólicas, morfológicas y de crecimiento, el grupo está formado por los géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulu*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Amarocho, 2011). Dentro de ellos, las cepas de *Lactococcus* han sido usadas por siglos como iniciadores en la manufactura de quesos y otros productos fermentados para su preservación y contribuyendo al sabor y aroma, además de ser productores de varios compuestos y bacteriocinas, siendo las últimas péptidos con actividad antimicrobiana contra muchas bacterias Gram positivas incluyendo microorganismos patógenos y esporulados (Tükel *et al.*, 2007).

Las BAL son utilizadas como cultivos bioprotectores que pueden ser considerados como aditivos que reducen el crecimiento de patógenos y microorganismos deteriorantes, además de conferir características organolépticas deseables. Los procesos de bioconservación utilizados en la industria involucran la utilización de cultivos protectores y sustancias producidas por algunas bacterias, principalmente, bacterias ácido lácticas (*Pediococcus acidilactici*, mezcla de cultivos acidolácticos, cultivo de *Lactobacillus curvatus*, Fermentado de *Lactobacillus curvatus*, metabolitos como enterocina AS-48) (Vanegas *et al.*, 2012)

### **Producción de bacteriocinas por BAL.**

Generalmente se asume cierta actividad antimicrobiana a las BAL, debida a la producción de ácidos orgánicos, diacetilo, peróxido de hidrógeno e incluso la inhibición podría ser atribuida a la familia de péptidos antimicrobianos conocidos como bacteriocinas (D'Angelis *et al.*, 2008).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por bacterias, normalmente contienen de 30 a 60 residuos de aminoácidos y usualmente tienen efectos bactericidas o bacteriostáticos. Las bacteriocinas muestran diferencias respecto al tipo de microorganismos productores, las producidas por bacterias Gram positivas tienen un tamaño pequeño, usualmente alrededor de 6 kDa presentando amplio espectro de actividad antimicrobiana, mientras que las producidas por bacterias Gram negativas son de mayor peso (20 kDa) y registran menos rango de inhibición bacteriana (Sánchez, 2008).

Muchas cepas producen bacteriocinas que contribuyen a la competitividad de las células productoras, el espectro antimicrobiano frecuentemente incluye organismos patógenos asociados a alimentos como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, aunque se ha atribuido actividad frente a bacterias Gram negativas como *E. coli* y *Salmonella* cuando la integridad de la membrana ha sido comprometida, como lo es después de un shock osmótico o tratamiento con pH bajo (De Vuyst Lu y Leroy, 2007).

Estudios reportan que BAL podrían producir más de una bacteriocina (Batdorj *et al.*, 2006). Dentro de las cuales, las bacteriocinas sintetizadas por *Lactococcus lactis* han sido ampliamente caracterizadas, la mayoría son péptidos catiónicos hidrófobos, los cuales forman poros en la membrana citoplásmica de células sensibles. La bacteriocina de *Lactococcus* mejor conocida es la nisina, un péptido de alrededor de 3.4 kDa producido por *L. lactis spp. lactis* que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas, incluyendo *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* y *Listeria spp.* (Tükel *et al.*, 2007).

### **Clasificación de bacteriocinas.**

Las bacteriocinas de BAL fueron clasificadas por Klaenhammer (1993) en 4 clases en base a su estructura y características.

Clase I: Lantibióticos, pequeños (< 5 kDa) péptidos activos sobre membrana, los cuales contienen aminoácidos como la lantionina, b-metil lantionina. nisina, lactacina 481, lactocina son algunos ejemplos de lantibióticos.

Clase II: Bacteriocinas pequeñas (< 10 kDa), estables al calor, no contienen lantionina, ejemplos de ellas son Lactococcina, Leucocina, Sakacina y se dividen en subgrupos: Clase IIa: Caracterizados por péptidos activos contra *Listeria* con secuencia consenso N-terminal (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys). Se dividen en 3 clases: 1) Clase IIa: Consiste en pequeños péptidos catiónicos sin secuencia homóloga específica, 2) Clase IIb: Consiste en la asociación de 2 diferentes péptidos para actividad completa y 3) Clase IIc: Requiere residuos de cisteína para su actividad como lactococina B.

Clase III: Son proteínas de alto peso (>30 kDa), lábiles al calor, como Helviticina, Acidofilucina.

Clase IV: Son bacteriocinas complejas, compuestas de proteína más restos químicos (lípidos, carbohidratos) requeridos para su actividad; ejemplos son Plantaricina, Leuconocina, Lactocina 27.

Monroy *et al.* (2009) sugiere la siguiente clasificación (Tabla 6) incluyendo 5 clases de grupos de bacteriocinas.

Tabla 6. Clasificación de bacteriocinas de acuerdo a sus características físicas y químicas.

Tipo	Características
<b>Clase I: Lantibióticos.</b>	Péptidos pequeños a nivel de membrana, presentan poca estabilidad al calor, péptidos policíclicos (<5 kDa) con aminoácidos modificados.
Clase IA	Péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana.
Clase IB	Péptido globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.
<b>Clase II: No lantibióticos.</b>	Bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente. Péptidos pequeños (<10KDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática.
Clase IIA	Péptidos activos contra <i>Listeria</i> , tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA1 y la sakacina P.
Clase IIB	Formadores de complejos para la formación de poros, consisten en 2 péptidos diferentes.
Clase IIC	Péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder.
<b>Clase III</b>	Bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles.
<b>Clase IV</b>	Bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica.
<b>Clase V</b>	Bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente.

Adaptado de Monroy *et al.* (2009)

La distinción entre bacteriocinas de BAL hace referencia a la clase de los lantibióticos y los no lantibióticos (clase II, III, IV). La actividad está basada en el mecanismo de acción para cada bacteriocina, es decir, si su actividad requiere la unión a un receptor específico de la superficie celular y la distribución relativa de ese receptor entre especies bacterianas divergentes. La mayoría de las bacteriocinas de la clase I y clase II son activas en un rango nanomolar, causando

la permeabilización de la membrana, conduciendo a la disipación del potencial de membrana y la fuga de iones, ATP y otras moléculas vitales diana (De Vuyst Lu y Leroy, 2007).

La nisina, una bacteriocina aprobada por la FDA para su uso en la industria de alimentos, es ampliamente activa contra bacterias Gram positivas y posiblemente la bacteriocina más ampliamente estudiada al ser reconocida por la FDA como una sustancia segura. Respecto a las bacteriocinas de bacterias Gram negativas, tienen un espectro de inhibición más reducido que las generadas por las bacterias Gram positivas. Empero de que las bacteriocinas podrían ser categorizadas como antibióticos, no lo son, dado que el efecto antimicrobiano de las bacteriocinas se distingue del de los antibióticos ya que estos últimos se dirigen comúnmente a la síntesis de la pared celular, degradan los ácidos nucleicos o tienen otras funciones enzimáticas, mientras que el objetivo más común para las bacteriocinas es la permeabilización de la membrana (Snyder y Worobo, 2014).

La producción de las bacteriocinas están relacionadas con el crecimiento y actividad de la cepa productora, estando correlacionada la biomasa obtenida con la cantidad de bacteriocina producida (Mondragón *et al.*, 2013).

### **Biosíntesis de bacteriocinas y modo de acción.**

La clarificación de la estructura de las bacteriocinas se estudió en los 1970s y en 1988 la nisina fue aprobada por la US Food Industry como una sustancia “GRAS” (*generally recognized as safe*), una denominación que reconoce la seguridad e inocuidad de las bacteriocina usada como aditivo. El interés respecto a las bacteriocinas adquirió un incremento en 1990s y la búsqueda aún continúa con enfoque en el riesgo de la resistencia antibiótica y la búsqueda de antibióticos que integren formulaciones naturales (Chen y Hoover, 2006).

Los genes que codifican la producción de bacteriocina y la inmunidad se organizan generalmente en grupos de operones y pueden localizarse en elementos movilizables, tales como los cromosomas asociados con transposones o a plásmidos. Las bacteriocinas se sintetizan principalmente como pre-péptidos

biológicamente inactivos que contienen un líder N-terminal, estos son modificados por otras proteínas o aminoácidos codificados por el grupo de genes antes de la exportación de la bacteriocina; las cepas productoras de bacteriocinas tienen que protegerse de la acción, el efecto tóxico de su propia bacteriocina lo que ocurre a través de la producción de proteínas de inmunidad específicas. A menudo el gen estructural de la bacteriocina y el gen de inmunidad se pueden localizar en el mismo operón. Para las bacteriocinas de las BAL se han descrito dos tipos de sistemas de inmunidad, el primero dependiente de la inmunidad específica de la proteína Lan I, que proporciona inmunidad evitando la formación de poros de las moléculas de bacteriocina que se han insertado en la membrana y el segundo depende del multicomponente ABC (Snyder y Worobo, 2014).

Las bacteriocinas de BAL son péptidos catiónicos que actúan en las membranas citoplasmáticas de microorganismos susceptibles mediante la formación de poros, un mecanismo que provoca una fuga de componentes intracelulares y metabolitos vitales. El mecanismo de acción de la nisina y otras bacteriocinas como la pediocina depende de la proteína de membrana celular, el potencial de membrana, el pH, la composición lipídica y la presencia de aminoácidos y dominios estructurales específicos. En el caso de la nisina, el mecanismo de acción utiliza el lípido II precursor de la pared celular, unido a lípidos como molécula de acoplamiento, para después inducir la formación de poros; el lípido II es el blanco de varias bacteriocinas modificadas (clase I) y las no modificadas (clase II) siendo el sistema de fosfotransferasa de manosa (PTS) un objetivo para bacteriocinas similares a la pediocina como la leucocina A, la pediocina PA-1/ ACh y la enterocina A (Brotz *et al.*, 1995).

Las bacteriocinas de Bacterias ácido lácticas son usualmente no citotóxicas frente a células eucariotas y fácilmente degradadas por enzimas proteolíticas, dada su naturaleza proteica. La vida media de las bacteriocinas de BAL es corta en el cuerpo humano o en el ambiente, lo cual minimiza la oportunidad de las cepas diana para interactuar con los fragmentos degradados de los antibióticos (Dridner *et al.*, 2016).

Los genes que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de bacteriocinas están presentes en grupos y pueden comprender combinaciones de un gen estructural que codifica un péptido líder y el propéptido lantibiótico, enzima modificadora, un transportador responsable de la exportación de la bacteriocina y en algunos casos para la ruptura del péptido líder, una peptidasa líder, una proteína implicada en la autoprotección de la célula huésped, componentes de un transportador, que también están implicados en la autoprotección de la célula productora y dos componentes de un sistema de autoinducción (Kuipers, Rink y Moll, 2011).

El modo de acción de las bacteriocinas puede variar, usualmente se consideran los siguientes:

Formación de poros: Los estudios muestran la capacidad de varias bacteriocinas del grupo denominado Lantibióticos para permeabilizar las membranas; como en el caso de la nisina, interactuando con el lípido II, la inducción de poros se ve favorecida por el potencial transmembrana negativo, aunque la nisina también puede formar poros en las células cuando no hay potencial eléctrico transmembrana. La interacción del lípido II con otras bacteriocinas, como LntA1, favorece la actividad antibacteriana (Kuipers, Rink y Moll, 2011).

Inhibición del crecimiento de esporas: Algunos lantibióticos inhiben la germinación de esporas de las especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* debido a la reacción entre los grupos tiol (-SH) en las proteínas de las esporas con la deshidroalanina en la posición 5 de algunas bacteriocinas como Subtilina y nisina, la sustitución de la deshidroalanina en la posición 5 por una alanina provoca la pérdida de la capacidad para inhibir el crecimiento de las esporas por parte de las bacteriocinas (Morris *et al.*, 1984).

Actividad antibacteriana sin formación de poros por interacción con el lípido II: La nisina puede interactuar con el lípido I y el lípido II, causando la acumulación de lípido I en la síntesis de peptidoglicano. La Plantaricina C, es una bacteriocina que tiene la capacidad de formar complejos entre lípido I y II, donde al unirse con el

lípidos I y el lípido II, inhibe la síntesis de este último, impidiendo la adición de la primera glicina de la cadena pentapéptica del lípido II. La Mersacidina y la Actagardina son bacteriocinas que tienen actividad a través de la unión al lípido II pero no forman poros, en cambio, ejercen una elevada actividad antibacteriana in vivo bloqueando el paso de transglicosilación en la síntesis de peptidoglicano (Kuipers, Rink y Moll, 2011).

Otras actividades: Cinnamicina y Duramicina son bacteriocinas que inhiben la fosfolipasa A2 por unión al sustrato de fosfatidiletanolamina en la membrana plasmática. También se ha reportado flip-flop lipídico inducido por nisina, donde nisina y Pep5 se unen a los ácidos lipoteicoicos y teicoicos, desplazando y activando N-acetil-alanina aminidasa y N-acetilglucosaminidasa, promoviendo con ello la actividad antibacteriana (Bierbaum y Sahl, 1985).

Desarrollo de la resistencia de las bacterias Gram positivas contra Lantibióticos: A pesar de la aplicación mundial de la nisina y su reconocimiento como aditivo seguro para la salud, se ha desarrollado poca resistencia contra la nisina. Existe un estudio sobre una cepa resistente de *Lactococcus lactis*, que creció en concentraciones de nisina 75 veces superior a la normal, mostraron que la pared celular de la cepa resistente tenía un espesor significativamente mayor lo que protegía el lípido II de la cepa de *L. lactis* frente a nisina (Kramer *et al.*, 2008).

### **Resistencia a antibióticos.**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios indeseables al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos), lo que provoca que los medicamentos se vuelvan ineficaces y las infecciones persistan. La RAM aumenta el costo de la atención sanitaria por mayor duración de las hospitalizaciones y la necesidad de una atención más intensiva; hasta el 2014 la tasa de multiresistencia en 480 000 casos de tuberculosis fue de 3.3 y 20% para casos tratados con

anterioridad; para quienes comenzaban un tratamiento contra el VIH la tasa de resistencia era del 15 y 40% para los que lo reiniciaban (OMS, 2016).

Los antibióticos contribuyen al tratamiento efectivo de enfermedades, desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, pudiendo actuar directamente sobre el microorganismo inhibiendo su crecimiento (bacteriostáticos) o causando su muerte (bactericidas). En 2004, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de America (*Infectious Disease Society of America*), IDSA por sus siglas en inglés, reportó que el 70% de los patógenos bacterianos que causan infecciones graves son resistentes al menos a uno de los fármacos usados en los tratamientos. Las bacterias son conocidas por emplear diferentes estrategias de resistencia a antibióticos, adquiriendo resistencia por mutación espontánea en los genes que codifican una proteína diana, por transferencia horizontal de genes de resistencia de otra bacteria, por alteración del sitio blanco del antibiótico o por bombear el antibiótico entrante fuera de la célula por un mecanismo de transporte. Estos procesos dificultan el tratamiento de infecciones, favoreciendo alta resistencia y multiresistencia en patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina (Hassan *et al.*, 2012).

La resistencia implica un riesgo de salud, a pesar de que poblaciones han utilizado racionalmente los antibióticos también se han visto amenazadas por la creciente aparición de cepas resistentes, comprometiendo vidas humanas al estar asociadas a altas tasas de morbilidad, aumento de estancias hospitalarias, mayores costes de tratamientos, mayores posibilidades de contagio y propagación (Gérvas, 2000).

Las causas de aumento a la resistencia de antibióticos pueden ser de distinta naturaleza, como la inactivación o modificación enzimática (aminoglucósidos, betalactámicos, cloranfenicol y eritromicina), alteraciones de la permeabilidad de la membrana por captación disminuída (aminoglucósidos, cloranfenicol, betalactámicos, fosfomicina, glucopéptidos y quinolonas), modificaciones de la diana bacteriana (en aminoglucósidos, betalactámicos, glucopéptidos, macrólidos

y tetraciclinas) y cambios en los sistemas enzimáticos bacterianos (en rifampicina y sulfamidas), pero el principal impulso se debe al uso excesivo de antibióticos (Pastor-Sánchez, 2006).

La resistencia a los antimicrobianos constituye el principal motivo de preocupación en salud pública y un problema para la inocuidad de los alimentos. Las consecuencias y los costos económicos mundiales de la resistencia antimicrobiana se calculan en 10 millones de muertes anuales y un descenso de 2 a 3.5% en el producto interno bruto global o unos 100 billones de dólares para el 2050 (FAO 2016).

En Europa se ha favorecido el aumento en el número de bacterias resistentes a antibióticos convencionales. España, Francia, Grecia e Italia, son países donde la frecuencia de bacterias resistentes se ha tornado dentro de las más altas del continente Europeo, siendo España uno de los países con mayores tasas de resistencia bacteriana, sobretodo en patógenos como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* o *Escherichia coli*; mientras que en países nórdicos como Dinamarca, Noruega y Suecia no se aíslan con frecuencia bacterias resistentes (Pastor-Sánchez, 2006).

En Colombia, los primeros informes sobre resistencia aparecieron en 2001, donde en unidades de cuidados intensivos para el antibiótico ciprofloxacino, utilizado en el tratamiento para *Staphylococcus aureus*, la resistencia reportada era de 60-63%, para *Staphylococcus coagulasa* negativa de 47 a 58% y para especies de *Enterococcus* un 25-44% y en hospitales de tercer nivel se reportó resistencia de un 52% para *S. aureus* y un 73% para *S. aureus* coagulasa negativa (Medina, 2014).

Los patógenos conocidos con las siglas “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter*) son considerados como las principales causas de infecciones nosocomiales en todo el mundo. La mayoría de estas bacterias son multiresistentes y figuran como una de las amenazas más

grandes dentro de la salud pública, que usualmente es causada por el uso inapropiado de los antimicrobianos (Drider et al. 2016).

*Listeria monocytogenes* es un bacilo corto, intracelular, que se encuentra dentro de los patógenos más importantes de origen alimentario, por su resistencia a condiciones ambientales, como pH bajo, altas concentraciones de sal, y tener la capacidad de sobrevivir a temperaturas de refrigeración (2-4 °C) y tratamientos insatisfactorios de pasteurización, considerándose como una posible amenaza en la seguridad de la industria alimentaria (Espinoza *et al.*, 2004).

### **Utilidad de las bacteriocinas frente a la inhibición de patógenos.**

Las bacteriocinas producto de BAL han sido de gran interés y utilidad en la industria alimentaria, dado que al ser consideradas como sustancias inocuas para la salud han sido utilizadas como conservadores o aditivos de preservación naturales, ya sea a través de la incorporación de BAL o la aplicación de la bacteriocina purificada, con mayor frecuencia nisina (Mondragón *et al.*, 2013).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) constituyen un problema creciente para la salud pública mundial. La mayoría de los quesos frescos que se elaboran en los países de América Latina y el Caribe, parte de una leche cruda obtenida en condiciones sanitarias deficientes. En el 2013 las ETAs se incrementaron en muchos países, donde el consumo de leche cruda es considerado como uno de los vehículos de transmisión de enfermedades, por lo que la fabricación de quesos a escala artesanal con leche sin pasteurizar puede constituir un elevado riesgo de contaminación con bacterias patógenas (Martínez, Montes y Villoch, 2016).

Las bacteriocinas, producto de BAL han sido utilizadas como aditivos en la preservación de alimentos por sus propiedades antimicrobianas, como lo es el caso de la nisina, aprobada por la FDA. Además del registro de seguridad de las bacteriocinas como sustancias GRAS, se ha probado su efectividad contra patógenos de importancia en alimentos. Una forma común para probar la actividad bacteriocina es el uso de medios de agar contenidos en placas Petri, derivados del

enfoque "spot-on-lawn" o las pruebas simultáneas directas, donde la producción y los cultivos indicadores se incuban simultáneamente antes del examen de las zonas de inhibición alrededor del crecimiento de las cepas productoras. La composición de los medios utilizados es un factor importante en los ensayos de inhibición en placas, los agentes gelificantes utilizados en medios sólidos pueden interferir con la difusión de la bacteriocina, limitando así la efectividad de estos métodos, en el agar M17, el fosfato de  $\beta$ -glicerol puede interferir con las zonas de inhibición causadas por bacteriocinas a partir de *Pediococcus acidilactici*. El uso de métodos basados en PCR también es útil para detectar genes responsables de la producción de bacteriocinas y regulación en cultivos de bacterias (And y Hoover, 2003).

La primera bacteriocina, designada como colicina, fue descubierta en 1925, a partir de ahí el número de bacteriocinas de bacterias Gram positivas y Gram negativas ha aumentado; dentro del primer grupo productor de bacteriocinas, figuran las BAL que tienen la facultad de matar o inhibir bacteria y que contrario a los péptidos producidos por células eucariotas, tienen actividades  $10^2$  a  $10^3$  veces más altas. Recientemente el uso de bacteriocinas solas o en combinación con antibióticos ha sido reconocido como una prometedora estrategia para ayudar en la lucha contra la resistencia antibiótica, donde destaca el efecto de las bacteriocinas de BAL en el mejoramiento de antibióticos, como agentes antivirales, como regulares de la microbiota, como agentes anti cáncer y como promotores de crecimiento en las plantas (Drider *et al.*, 2016).

El uso de bacteriocinas tiene un interés creciente como alternativa a los antibióticos clásicos, sin embargo algunos péptidos antimicrobianos (AMPs) son tóxicos para células de mamíferos. Similar a las endolisinas codificadas por fagos, las bacteriocinas funcionan insertándose en la membrana plasmática. Según estimaciones el 99% de todas las bacterias producen al menos una bacteriocina. Las bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecium* son efectivas contra 29 diferentes especies de *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE), incluidas cepas pandrogoresistentes y otros patógenos (*Pseudomonas aeruginosa*,

*Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* resistente a metilina y *E. coli*) (Allen *et al.*, 2014)

La compañía farmacéutica Biosynexus ha empleado la bacteriocina caracterizada nisina probando su efecto antimicrobiano en una presentación de crema tópica que actúa sobre cepas de *S. aureus* que colonizan las fosas nasales, además de que dicha bacteriocina ha mostrado actividad anticonceptiva y protectora natural. En Nueva Zelanda, el suplemento dietético BLIS K12® es vendido como inhibidor de bacterias responsables del mal aliento debido a que contiene una cepa de *S. salivarius* que produce las bacteriocinas salivaricina A2. Las bacteriocinas como la cinamicina también podrían tener aplicaciones, ya que ésta inhibe la función de las enzimas fosfolipasa A2 y la enzima convertidora de angiotensina, involucradas en el sistema inmune y en el mantenimiento de la presión sanguínea de humanos (López *et al.*, 2008).

Las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas también han sido estudiadas en la prevención de infecciones urogenitales y en terapias biomédicas. De esta manera, los beneficios potenciales de las bacteriocinas en la industria de los alimentos y en el área clínica son relevantes. De igual manera se hace necesario conocer los sistemas que regulan la expresión de los genes involucrados en la producción de éstas moléculas (Cotter *et al.*, 2005).

### **Métodos de purificación y detección de bacteriocinas.**

Las estrategias clásicas de purificación de bacteriocinas incluyen: a) concentración de péptidos presentes en los sobrenadantes de cultivos y precipitación por sal o extracción ácida b) cromatografía de intercambio iónico, c) interacción hidrofóbica y d) filtración en gel o cromatografía en fase reversa (RP-HPLC). Aunque muchas bacteriocinas muestran una actividad reducida a altas concentraciones de sal, el sulfato de amonio concentrado al 80% de saturación no interfiere en la actividad antimicrobiana. Las metodologías mayormente usadas para visualizar la actividad de péptidos antimicrobianos incluyen ensayos de difusión (alícuotas depositadas en pocillos), ensayos de micro dilución (CMI) y la técnica *spot on lawn* (alícuotas

sobre césped de agar con células sensibles), donde fracciones de bacteriocinas o cultivo de bacterias productoras de bacteriocinas son probadas contra un patógeno indicador sobre el que se visualiza actividad (halos de inhibición) (Saavedra y Sesma, 2011).

Una vez localizados los péptidos antimicrobianos, SDS-PAGE representa una técnica para estimar la masa molecular de las bacteriocinas parcial o completamente purificadas para detección directa de péptidos antimicrobianos. (Saavedra y Sesma, 2011)

#### Pruebas de susceptibilidad para detección de bacteriocinas.

Dentro de los estudios sobre pruebas de susceptibilidad a bacteriocinas en bacterias resistentes a antibióticos figuran varias técnicas discutidas en diferentes estudios:

Aunpad *et al.* (2007) evaluaron la actividad de los sobrenadantes crudos de BAL aislados de agua y suelo, fueron probados contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), todos los aislados mostraron zonas de inhibición mayores a 5 mm. Se emplearon el método de co-cultivo y el método de difusión en pocillos. Para el primero las placas que contenían colonias aisladas de bacterias con capacidad de producción de bacteriocinas fueron depositadas sobre 5 mL de agar blando (1.2% de agar) inoculado con la suspensión de células indicadoras a una concentración de  $10^5$  UFC/mL. Se incubaron a 37 °C por 16-18 h. Para el método de difusión en pocillos, se agregó a cada pocillo de 5 mm en agar soya tripticasa 20 µL de sobrenadante crudo inoculado al 1% de cepa indicadora preparada en una suspensión hasta alcanzar una densidad óptica de 0.1 (600 nm), se incubó por 18 h. Los sobrenadantes crudos libres de células fueron obtenidos de un cultivo en un matraz de 200 mL inoculado al 1% ( $10^6$  UFC/mL) de un cultivo de una noche. Los cultivos fueron incubados a 37 °C por 12 h, después fueron centrifugados a 10,000 g por 20 min seguidos de una microfiltración. Los resultados obtenidos en el método de co-cultivo y en el de difusión en pocillos, mostraron zonas de inhibición mayor a 5 mm para SARM.

Karska-Wysocki *et al.* (2009) probaron la actividad de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). *L. acidophilus* y *L. casei* fueron purificados e identificados por pruebas bioquímicas y métodos moleculares por análisis de secuencia del gen 16S rRNA con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). SARM fueron aislados de diferentes muestras clínicas y confirmadas la presencia de genes *coa* y *mecA*. La actividad antimicrobiana de las BAL fue probada usando método de difusión en agar en medio sólido y medio líquido, modificados de acuerdo a lo descrito por Jacobsen *et al.*, (1999)<sup>16</sup> y Maragkoudakis *et al.*, (2006)<sup>17</sup>. Para las pruebas del efecto de inhibición de BAL, se depositaron 3 µL de BAL provenientes de un cultivo de 24 h a 37 °C de leche peptonada sobre agar MRS (7 mL) al 1.2% de agar e incubados por 24 h a 37 °C en anaerobiosis, posteriormente se depositaron 200 µL de un cultivo de SARM en BHI sobre 7 mL de agar semisólido (0.7%) de BHI y después se vertieron a la superficie de la placa y se incubaron por 24-48 h a 37 °C bajo condiciones de anaerobiosis. Se determinó que *L. casei* mostró zonas de inhibición contra SARM de hasta de 2 cm y *L. acidophilus* de 3 cm. Para la actividad en medio líquido los cultivos se realizaron en 2 medios distintos (leche peptonada y medio selectivo para SARM), las mezclas contenían  $3.8 \times 10^6$  células de SARM en 10 mL de medio en presencia de  $1.3 \times 10^6$  células/mL de *L. acidophilus* y  $3.2 \times 10^6$  células/mL de *L. casei*, los resultados mostraron que el 99% de células de SARM fueron eliminados.

Svetoch *et al.* (2009) determinaron el espectro antibacteriano de péptidos antimicrobianos frente a patógenos asociados a infecciones nosocomiales, que incluye a Gram negativos y Gram positivos frente a la actividad de las bacteriocinas E50-52 y B-602, producidas por cepas de *Enterococcus faecium* 50-52 y *Paenibacillus polymyxa*, respectivamente. De 64 cepas asociadas a enfermedades nosocomiales identificados con MicroScan y con genes de resistencia a Betalactamasa (*bla*TEM, *bla*SHV, y *bla*CTX-M) se identificaron, *Citrobacter freundii* (8), *Acinetobacter baumannii* (11), *Escherichia coli* (9), *Klebsiella pneumoniae* (10), *Proteus spp* (6), *Pseudomonas aeruginosa* (10), *Staphylococcus aureus* (10). La actividad fue probada por concentración mínima

inhibitoria (CMI) a partir de un cultivo bacteriano de prueba ( $10^5$  UFC/mL) y fue inoculado en caldo Mueller-Hinton (MH) que contenía la dilución antibacteriana correspondiente; las placas de microdilución fueron incubadas en condiciones aeróbicas a 37 °C durante 24 h. Los resultados mostraron que las bacterias Gram negativas como *A. baumannii*, *C. freundii*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Proteus spp.*, fueron sensibles a B-602 con concentraciones de 0.025 a 0,05 µg/mL, y las Gram positivas, como *S. aureus* fueron susceptibles en los niveles de 0.025 µg/mL.

Riaz *et al.* (2010) probaron la actividad de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus acidophilus* sobre *E. coli* resistentes a Cefalosporina; *E. coli* fue aislada de pus utilizando la metodología convencional. Para la producción de bacteriocinas, cepas de lactobacilos fueron seleccionados mediante el uso de medios selectivos. Las cepas probióticas fueron aisladas de yogurt, materias fecales de humanos, pollos, loros y gatos, sólo se encontraron dos cepas para producir bacteriocinas que tienen potencial antimicrobiano. La caracterización bioquímica identificó a *L. fermentum* y a *L. acidophilus*. Ambas cepas mostraron el máximo crecimiento a 25 °C y 35 °C, respectivamente. La bacteriocina producida por *L. fermentum* y *L. acidophilus* se puede utilizar para el control de la infección de *Escherichia coli* resistente a cefalosporina, la sensibilidad se determinó por el método de difusión en disco, donde cada pocillo se llenó con 100 µL de sobrenadante de cultivo productor de bacteriocina, las cepas indicadoras se cultivaron en agar BHI. Se incubaron en condiciones anaerobias a 37 °C por 48 h. No hubo diferencia significativa entre los tamaños de las zonas de inhibición producidos por *L. fermentum*, y *L. acidophilus*.

Bendjeddou *et al* (2011) probaron la actividad de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, aislada de heces de lactante sano; y fue probada sobre patógenos resistentes a antibióticos como *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *P. aeruginosa* resistentes a Cefotaxima (CXT) y Ceftazidima (CAZ) y *S. aureus* resistente (SARM). La bacteriocina fue purificada por cromatografía en fase reversa. La actividad antibacteriana se probó mediante método de difusión en pocillos utilizando los sobrenadantes colectados

de un cultivo de 16 h en 10 mL de caldo MRS, el cual fue centrifugado a 12,000 g por 30 min a 4 °C, después 15 mL de agar MH conteniendo  $10^7$  UFC/mL de bacteria indicadora fue vertido en placas estériles, después de la solidificación pocillos de 6 mm de diámetro fueron cubiertos con 50  $\mu$ L de sobrenadante, las cajas fueron pre incubadas a 4 °C por 2 h para permitir la total difusión del sobrenadante y después fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Los halos de inhibición reportados fueron: *E. coli*: 18-22 mm. *C. freundii*: 16-20 mm. *C. diversus*: 16-20 mm. *K. oxytoca*: 15-20 mm. *K. pneumoniae*: 16-18 mm. *Shigella dysenteriae*: 17-18 mm. *E. cloacae*: 15-18 mm. *S. aureus*: 14-20 mm.

Sourabh *et al.* (2011) evaluaron el potencial antagónico de 11 bacterias probióticas de especies de *Enterococcus*, *Bacillus* y *Lactobacillus* probaron su actividad contra patógenos resistentes a antibióticos. Las bacterias probióticas fueron identificadas molecularmente como *E. faecium*, *Bacillus coagulans*, *L. fermentum*, *Lactobacillus plantarum* y fueron probados contra *Listeria monocytogenes*-MTCC 839, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri*, *E. coli*. Se utilizaron 3 métodos: método de agar bit (Barefoot y Klaenhammer, 1983),<sup>22</sup> el método de difusión en pocillos (Schillinger y Lucke, 1989) y método de triple capa de agar (Todorov y Dicks, 2005). Para el método directo de agar bit, las colonias de probióticos fueron depositadas en placas de agar MRS previamente revestidas con agar MRS (0.75%) del cultivo indicador, la capa del indicador se preparó adicionando 0.25 mL de una dilución de  $10^{-1}$  de un cultivo de 24 h a 10 mL de agar semisólido de MRS. El contenido del tubo se vertió sobre la superficie de placas de agar MRS. Después de depositar múltiples cepas de probióticos, las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C en anaerobiosis. Después de la incubación, la capa del indicador se examinó para determinar las zonas de inhibición que rodean a cada productor de sustancias tipo bacteriocinas. Para el método de triple capa de agar las colonias sobre las placas de agar MRS se cubrieron con una segunda capa de agar MRS suplementado con Delvocid (50 mg/L). Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h, en un matraz anaeróbico. Las placas con menos de 50 colonias se cubrieron con 1 mL de células activas crecientes de indicador probiótico ( $10^6$  UFC/mL), incrustadas en una capa fina (aproximadamente 10 mL)

de agar BHI semi-sólido suplementado con 1% de agar (W/V). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Para el método de difusión en pocillos, las cajas de agar MRS (0.7% de agar) se cubrieron con 7 mL de agar blando inoculado con 0.3 mL de cultivo indicador de 24 h. Los pocillos fueron cubiertos con 0.03 mL de sobrenadante de cultivo de probiótico, las cajas fueron incubadas en anaerobiosis por 24 h a 25 °C. En los resultados para el método de agar bit todos los aislados exhibieron actividad contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*. Excepto *L. fermentum* y *L. plantarum* mostraron inhibición contra *B. cereus*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* en método de difusión en pocillos y para el método de triple capa de agar ninguno de los aislados mostró actividad contra *L. monocytogenes*.

Aween *et al.* (2012) aislaron 32 BAL de 13 muestras de miel de marcas comerciales en Malasia, seis fueron identificadas como *L. acidophilus* utilizando el método API CHL50, los sobrenadantes fueron probados en cepas resistentes de *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis*. La actividad antimicrobiana de los seis aislados de *L. acidophilus* fue evaluada por el método de doble capa de agar, la BAL fue inoculada en alícuotas estandarizadas sobre agar MRS e incubada en condiciones de anaerobiosis a 30 °C por 24 h, después de la incubación las cajas fueron cubiertas con 15 mL de agar nutritivo conteniendo el microorganismo indicador a una concentración de  $10^6$  UFC/mL se incubaron en condiciones aerobias por 24 h a 30 °C. Además se probó la actividad de los sobrenadantes de *L. acidophilus* utilizando placas de microdilución, los sobrenadantes se obtuvieron por filtración después de centrifugarse a 6500 g por 15 min, este sobrenadante proviene de un cultivo en caldo MRS de 8 h de crecimiento a 30 °C; se depositaron 200  $\mu$ L de la bacteria indicadora ( $10^4$  UFC/mL) y 100  $\mu$ L de sobrenadante en los pocillos de las placas de microdilución y se incubaron a 30 °C por 24, 48 y 72 h; el crecimiento bacteriano se estimó usando un lector de microplacas a 650 nm. Respecto a los resultados reportados por el método de doble capa de agar los halos de inhibición fueron de 25-32 mm para *S. aureus* ATCC 25923, 14-21.5 mm para *S. epidermidis* ATCC 12228 y 11.5-18.5 mm para *B. subtilis*. En los ensayos de actividad antibacteriana utilizando los sobrenadantes de BAL se logró reducir el porcentaje de crecimiento de bacterias

indicadoras en un rango de 40 a 80% dentro de las 24 h de incubación y se mostró inhibición completa de *S. aureus* hasta las 72 h de incubación.

Lee *et al.* (2013) analizaron la bacteriocina KU24 producida por *Lactococcus lactis* KU24, mostró actividad inhibitoria contra SARM. *L. lactis* fue aislado a partir de *kimchi* casero e identificada por secuenciación del gen 16S rRNA. *L. lactis* se cultivó en medio MRS a 35 °C; para determinar la actividad antimicrobiana se utilizó el método Spot on lawn, se utilizó agar semisólido sembrado con 1% (V/V) del microorganismo indicador. La bacteriocina parcialmente purificada se preparó en diluciones seriadas hasta  $10^{-5}$  y 5 µL de cada dilución fue puesto sobre las cajas. Para la preparación de la bacteriocina parcialmente purificada, *L. lactis* fue inoculado en 2 L de caldo MRS en fase estacionaria a 35 °C por 18 h. Las células fueron removidas por centrifugación a 10,000 g por 20 min a 4 °C. Los sobrenadantes fueron colectados y precipitados por sulfato de amonio al 60%. Los precipitados fueron colectados por centrifugación a 10,000 g por 20 min a 4 °C y resuspendidos en 100 mL de fosfato de potasio 0.1 M (pH 7) y luego dializados contra 2 L de buffer de fosfato de potasio 20 mM por 18 h en un Spectra-Por para diálisis de membrana. Los precipitados mostraron actividad de 200 a 6,400 AU/mL contra SARM. Para el cálculo de la actividad de la bacteriocina se utilizó la siguiente fórmula:  $AU/mL = 2^n \times 200$ , donde “n” representa número de dilución final con zona clara de inhibición.

Kaur *et al.* (2014) evaluaron la susceptibilidad de *E. faecium* resistente a vancomicina frente a los efectos de nisina (forma comercial), nisina combinada con pediocina (producida por *Pediococcus pentosaceus*) y enterocina (producida por *E. faecium*). Los métodos de susceptibilidad fueron Spot on lawn y método de difusión en pocillos. Para el método de Spot on Lawn fueron depositados sobre cajas de agar Triptona-glucosa extracto de levadura (TGE) 5 µL de la bacteriocina parcialmente purificada de *E. faecium* y *P. pentosaceus* cultivados en medio MRS, después se vertió agar semisólido (0.75%) con células de microorganismo indicador para luego ser incubadas. La actividad fue reportada como AU/mL. Para el método de difusión en pocillos, 5 mL de agar TGE conteniendo 0.75% (V/V) se

sembraron con 1% de cultivo de una noche de microorganismo indicador, el agar inoculado fue vertido sobre placas de agar TGE, después se llenaron los pocillos de 8 mm con 80  $\mu$ L de la bacteriocina, las placas fueron mantenidas a 5 °C por 2 h y luego se incubaron por 18 h a 37 °C. *E. faecium* resistente a vancomicina registró inhibición a concentraciones de 14, 2,187.5 y 3,750 AU/mL para Nisina, Pediocina y Enterocina, respectivamente.

Lü *et al.* (2014) estudiaron la bacteriocina MXJ32 (lactocina), producida por *Lactobacillus coryneformis*, identificada por secuencia del gen 16S rRNA; purificada por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico. La masa molecular de lactocina se estimó por espectro de masa molecular y se determinó la secuencia de aminoácidos. *L. coryneformis* se aisló de *Jiangshui cai*, una bebida fermentada casera, y se seleccionó de una serie de BAL empleando el método de doble capa modificado (Voulgari *et al.* 2010)<sup>29</sup> que consiste en inocular la BAL sobre la superficie de agar MRS como 2 líneas paralelas (2 cm), después se adiciona 10 mL de agar Luria Bertani (LB) sobre la placa de MRS. Se extiende una suspensión de cepa indicadora (30  $\mu$ L) sobre el agar LB. El cultivo fue incubado a 37 °C por 24 h. Para observar la producción de bacteriocinas, se utilizó sulfato de amonio a diferentes concentraciones. Las células se incubaron por separado en 100 mL de caldo MRS a 30 °C por 48 h, las células fueron removidas por centrifugación (8,000 rpm, 4 °C, 15 min), se adicionó sulfato de amonio al 40% al sobrenadante libre de células hasta precipitación de proteínas. La actividad antimicrobiana fue determinada por el método de difusión en pocillos, 5 mL de agar estéril al 2% de agar y taza Oxford de 9 mm fue puesta sobre el agar, se adicionaron 20 mL de medio LB al 0.75% de agar con aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/mL, se retiraron las tazas Oxford y se adicionaron 200  $\mu$ L de solución muestra a cada pocillo, las placas fueron refrigeradas a 4 °C por 2 h para una adecuada difusión y luego incubadas a 37 °C por 12 h. Adicionalmente se realizó la prueba de CMI con bacteriocinas purificadas. Los resultados obtenidos indican que la bacteriocina MXJ32A puede inhibir patógenos alimentarios incluyendo Gram positivos y Gram negativos. Los diámetros de inhibición reportados para patógenos resistentes a antibióticos oscilan entre 21-

22.5 mm para *Salmonella* 36T, 1006D, 557D, 798D Y 87T4; de 20.7-23.7 mm para *S. aureus* 20.7-23.7 mm y *Enterobacter sakazakii* de 18.7-22.1 mm. La concentración mínima inhibitoria para *S. aureus* y *E. coli* fue de 10 mg/mL.

Shokri *et al.* (2014) probaron la actividad de sustancias inhibitoras tipo bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecium* contra cepas de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (ERV). La susceptibilidad fue evaluada a través del método Spot on lawn, se utilizó caldo soya tripticasa (0.6% de extracto de levadura y 1.5% de agar), se depositaron 2  $\mu$ L de un cultivo de *Enterococcus* sobre la superficie del agar y se incubados por 24 h a 30 °C, luego de la incubación fue superpuesta una capa de agar con  $10^7$  células/mL de *Enterococcus* resistente a vancomicina (ERV). Los resultados mostraron inhibición para ERV con zonas mayores a 3 mm, pero no se mostró inhibición para SARM. Se evaluaron los efectos de pH, la actividad enzimática y la exposición a rayos UV de las sustancias tipo bacteriocinas. El peso molecular de la sustancia tipo bacteriocina se estimó en 35 kDa a través de electroforesis en gel de poliacrilamida.

Manzoor *et al.* (2016) probaron la eficacia de bacterias ácido lácticas contra uropatógenos resistentes a antibióticos. Las BAL fueron aisladas de frutas podridas y vegetales de diferentes mercados de Pakistán. Se utilizó agar MRS para el crecimiento de cultivos y características morfológicas. Se probó la actividad de BAL frente a uropatógenos resistentes como *Candida albicans*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *E. faecalis*. Las BAL fueron identificadas por pruebas bioquímicas y verificadas por secuenciación del gen 16S rRNA, se identificaron *L. acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *L. casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus salivarius*, *L. fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus animalis*, y *L. plantarum*. Para el análisis de actividad de BAL contra uropatógenos se empleó el método de difusión en disco, que consistió en inóculo de BAL y uropatógeno a concentración  $1 \times 10^5$  UFC/mL. Para la producción de sustancias inhibitoras tipo bacteriocinas, los cultivos fueron centrifugados a 6,000 g por 15 min a 4 °C, los sobrenadantes fueron neutralizados a pH 7 con 1 M de NaOH y esterilizado por filtración con

filtros de 0.45  $\mu\text{m}$ , estos sobrenadantes fueron utilizados para el método de difusión en pocillos en agar; los uropatógenos indicadores fueron inoculados en caldo BHI y dispuestos en cajas con agar BHI al 1% del uropatógeno, en cada pocillo fueron dispuestos 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante libre de células e incubadas a 37 °C en condiciones anaeróbicas. Los resultados obtenidos mostraron zonas de inhibición alrededor de 10 mm para el método de difusión en disco y mayores a 28 mm para el método de difusión en pocillos, 6 de los 7 uropatógenos mostraron inhibición por los aislados de *Lactobacillus*.

Yi *et al.* (2016) estudiaron la purificación, caracterización y el mecanismo bactericida de *L. coryneformis* señalado como XN8 contra cepas resistentes a antibióticos. *L. coryneformis* fue aislado de Jiangshui casero, una bebida fermentada, y fue identificado por secuencia del gen 16S rRNA. *L. coryneformis* es productor de la bacteriocina identificada como lactocina XN8-A (LXA), la masa molecular se determinó por MALDI-TOF MS de 3,100.0242 Da. Se probó el efecto de inhibición mediante método de doble capa de agar para seleccionar a la BAL con mayor actividad. Se realizó el método de difusión en pocillos de acuerdo a la metodología de Lü *et al.* (2014)<sup>14</sup>. El método de doble capa fue utilizado para evaluar la actividad antimicrobiana y seleccionar el aislado de BAL que mostró mayor inhibición, para lo cual se realizó la siembra en agar MRS de 2 líneas paralelas, se adicionó agar LB y se extendieron 30  $\mu\text{L}$  de la cepa indicadora en fase exponencial para ser incubados a 37 °C por 24 h. Para el método de difusión en pocillos en las cajas se dispuso de 5 mL de agar estéril, 20  $\mu\text{L}$  de cepa indicadora ( $10^6$  UFC/mL) y 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, se incubaron a 37 °C por 12 h. Respecto a los resultados obtenidos los halos reportados fueron de 19.7-20.6 mm para *Enterococcus sakazakii* resistente, 17.4-18.4 mm para especies de *Salmonella* resistentes y de 18.8-22.3 mm para *S. aureus* resistente.

## II. JUSTIFICACIÓN

---

El control de las infecciones causadas por microorganismos resistentes a antibióticos es uno de los retos más importantes que se tienen planteados en el área de salud. Debido a la caracterización de las bacterias ácido lácticas (BAL), se hace necesario destacar sus propiedades útiles en el tratamiento de patologías infecciosas (Larrea, Flórez y Huapaya, 2007).

Las bacteriocinas son péptidos sintetizadas con el propósito de inhibir el crecimiento de otras bacterias. Pueden ser evaluadas como antibióticos, pero difieren de estos debido a que las bacteriocinas son proteínas sintetizadas en el ribosoma y los antibióticos son metabolitos secundarios sintetizados generalmente en la fase estacionaria del crecimiento microbiano, las células productoras son inmunes a éstas, su estructura polipeptídica es de mayor peso molecular y su efecto de acción está relacionado a la cepa que la produce (Camargo, Sánchez y Salazar, 2009).

Los beneficios de las bacteriocinas en la salud humana, en especial del grupo denominado lantibióticos, adquiere especial interés ya que presentan varias características y ventajas, tienen un espectro de inhibición específico, un sistema de autorregulación, estabilidad química y la relación producción-costos es efectiva; por esta razón el consumo en la industria alimentaria y farmacéutica se basan en las bacteriocinas producidas especialmente por el género *Lactobacillus* (Cristóbal, 2008).

López *et al.* (2008) señalan el efecto de las bacteriocinas como mersacidina y lactacina, producidas por especies de *Bacillus spp.* y nisina, producida por *Lactococcus lactis*, con potencial actividad frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, *Enterococcus* (resistentes a vancomicina), *Streptococcus* (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. mutans*), *Clostridium botulinum* y *Propionibacterium acnés*.

Estudios en modelos animales han mostrado resultados positivos luego del uso de antibióticos como la mersacidina en el tratamiento de infecciones causadas por *S. pneumoniae* y *S. aureus* resistentes a metilina, además de terapias bucales, mal aliento y tratamiento de gingivitis (López *et al.*, 2008).

La investigación en la obtención de nuevas bacteriocinas de BAL aisladas de productos lácteos se ha desarrollado en los últimos años, mostrando un papel importante en procesos de bioconservación y producción de antibióticos, entre ellas, las del género *Lactobacillus* son beneficiosas para la salud utilizadas como probióticos (Durán *et al.*, 2010).

Los quesos son una fuente importante de bacterias lácticas, así como de microorganismos patógenos cuando existe una inadecuada manipulación y conservación. La producción de queso en México se estima de 266.2 mil toneladas métricas, con un consumo per cápita de 2.84 Kg, con una tendencia a la alza hasta el 2020 de acuerdo con SAGARPA (2011).

En el estado de Baja California existen cavas de quesos, donde 30 empresas producen mensualmente 24 toneladas de queso artesanal. La elaboración de quesos artesanales del tipo fresco y panela se elabora con leche no pasteurizada, incluso sin la adición de conservadores que puedan afectar el proceso de elaboración, maduración y conservación del queso. Algunas variedades de quesos elaboradas involucran un periodo de tiempo para ser añejados en un ambiente con 90% de humedad por periodos de 4 meses, un año y dos años (Olivares, 2008 y Pérez, 2013).

Una de las áreas más importantes del estudio de las bacteriocinas es la investigación de su naturaleza química y la bioquímica molecular de su producción, debido a su potencial aplicación en la bioconservación de alimentos, en la medicina frente a cepas resistentes y en el cuidado del medio ambiente. El uso de BAL o sus bacteriocinas, representan una alternativa eficiente para la inhibición de bacterias saprófitas y patógenas, así como posible antibiótico con actividad frente a cepas resistentes (De la Fuente, 2009).

Debido a lo anterior es importante realizar investigaciones que permitan conocer las propiedades de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas en la inhibición de cepas de interés clínico resistentes a antibióticos con el fin de proponer su uso como posible tratamiento antimicrobiano.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Durante la última década, la demanda por alimentos y bebidas que mejoren o beneficien la salud humana ha aumentado en muchas partes del mundo junto con el incremento de los costos de salud, el aumento de la expectativa de vida y el deseo de una mejor calidad de vida (Ozen, Pons y Tur, 2012).

Se ha incrementado el interés por el consumo de alimentos de calidad, a nivel mundial las enfermedades transmitidas por alimentos conocidas como ETAs han incrementado. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) los alimentos se asocian a la causa de más de 200 enfermedades, causando la muerte de unos 2 millones de personas al año, en su mayoría niños por ETA (OMS, 2014).

Los alimentos como mariscos, vegetales, carnes rojas y blancas, leche y sus derivados están involucrados en la transmisión de enfermedades, por microorganismos contaminantes como *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, entre otras (Villanueva, 2010).

En Europa la morbilidad relacionada con alimentos contaminados es la segunda causa de muerte, estimándose de 50, 000 a 300, 000 casos de gastroenteritis por cada millón de personas al año (De la Fuente y Barboza, 2009). En Estados Unidos la gastroenteritis afecta de 250 a 350 millones de personas anualmente. De igual forma, la Secretaría de Salud en México ha reportado que bacterias, protozoarios y virus son transmitidos por alimentos y son responsables de enfermedades como el cólera, fiebre tifoidea, shigelosis, brucelosis, salmonelosis, amebiasis, entre otras (De la Fuente, 2009).

Baja California se encuentra en el lugar número 19 entre las entidades con mayor prevalencia de inseguridad alimentaria en el ámbito nacional. De acuerdo con el Plan Estatal de Desarrollo del Gobierno del Estado reporta a las intoxicaciones

alimentarias bacterianas dentro de las primeras 20 causas de morbilidad en Baja California hasta 2013 (Gobierno del Estado de Baja California, 2015).

Aunado a lo anteriormente expuesto, se encuentra el fenómeno de la resistencia que ha sido ampliamente documentado desde el descubrimiento de la penicilina. La velocidad a la que se desarrolla la resistencia ocurre a la par de la propagación de patógenos. El incremento en la resistencia antibiótica es reconocido como una crisis global que requiere una atención inmediata por la industria farmacéutica e instituciones gubernamentales (Cavera *et al.*, 2015).

Las infecciones causadas por bacterias multirresistentes tienen una alta tasa de morbilidad y mortalidad. Asimismo, incrementan el costo por la estancia hospitalaria y complicaciones. Se calcula que el costo anual en los Estados Unidos por la resistencia antibiótica es entre los 100 millones y 30 billones de dólares (Bustamante, 2015).

*S. aureus* resistente a meticilina (*SARM*) es la principal causa de infecciones bacterianas que involucra el torrente circulatorio, el tracto respiratorio, la piel y los tejidos blandos. Es una de las causas más comunes de infecciones nosocomiales; la tasa de mortalidad asociada a infecciones por *SARM* invasivas se calcula es de 20% en los Estados Unidos (Luján, 2013).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo de microorganismos de gran importancia ya que son los componentes fundamentales en la manufactura de alimentos fermentados y elaborados de forma artesanal, como queso, yogurt, vino, entre otros. Duran *et al.* (2010) y Cristóbal (2008) destacan la capacidad de las BAL para producir compuestos proteínicos antimicrobianos que inhiben cepas sensibles y son producidas tanto por bacterias Gram positivas como Gram negativas, denominadas bacteriocinas (Duran *et al.*, 2010 y Cristóbal, 2008).

La mayoría de las bacteriocinas son efectivas contra microorganismos patógenos importantes involucrados en enfermedades transmitidas por alimentos, tales como

*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp* (Beristain, Palou y López, 2012).

De acuerdo con Durán *et al.* (2010), el queso es un excelente medio para el crecimiento de microorganismos debido a su alto contenido de agua, su pH y la variedad de nutrientes que éste posee, al cual se asocia principalmente la presencia de bacterias ácido lácticas (BAL), que son consideradas como conservantes naturales seguros e inoctras (*Generally Recognized as Safe*) por la Administración de Alimentos y Drogas de EE. UU. (FDA) (Durán *et al.*, 2010).

De acuerdo a la bibliografía analizada aún no se tienen estudios en la ciudad de Tijuana B.C., que evalúen la actividad antimicrobiana de especies de BAL aisladas de productos lácteos, especialmente quesos. Es necesario generar estudios que permitan determinar la actividad de bacteriocinas planteada como una alternativa al uso de antibióticos con actividad frente a bacterias multiresistentes.

#### IV. OBJETIVO GENERAL

---

Evaluar el efecto de inhibición de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas sobre microorganismos patógenos de interés clínico resistentes a antibióticos mediante técnicas de concentración mínima inhibitoria, para proponer su uso en el tratamiento de cepas patógenas resistentes a antibióticos.

#### V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

1. Determinar el tipo y tamaño de muestras mediante una investigación documental de los sitios de elaboración de quesos artesanales en Baja California para obtener la fuente natural de aislamiento de los microorganismos productores de bacteriocinas.
2. Aislar bacterias ácido lácticas de quesos artesanales mediante el crecimiento en medios diferenciales y selectivos para seleccionar las cepas potenciales en la producción de bacteriocinas.
3. Identificar bacterias ácido lácticas mediante el uso de pruebas bioquímicas y técnicas de tinción, para seleccionar cepas potencialmente productoras de bacteriocinas.
4. Identificación molecular de especies de bacterias ácido lácticas y obtención de perfiles de proteínas para evaluar la producción de bacteriocinas por BAL.
5. Realizar ensayos de inhibición mediante técnica *spot on lawn* para determinar la capacidad de inhibición de bacteriocinas producidas sobre microorganismos patógenos de interés clínico resistentes a antibióticos como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE), *Escherichia coli*, resistente a amoxicilina y cotrimazol.

6. Realizar tratamiento estadístico de los resultados recolectados a partir de la evaluación de las muestras analizadas mediante el procesamiento de datos en el software SigmaPlot versión 12.0 para determinar la correlación del efecto inhibitorio de las bacteriocinas para proponer su uso como antibiótico en el tratamiento de cepas patógenas resistentes y multiresistentes.

## VI. HIPOTESIS

---

Las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus spp.* aisladas de quesos artesanales de consumo en Baja California, tienen un efecto positivo en la inhibición de microorganismos patógenos de interés clínico resistentes a antibióticos.

## VII. METODOLOGÍA

---

Se realizó un estudio Analítico-Transversal, realizado durante el periodo de enero a junio de 2016 en la región de Baja California. Los sitios de muestreo corresponden a los centros de producción y comercialización de quesos artesanales ubicados en la región vitivinícola conocida como “Ruta del Vino” que va de norte a sur y atraviesa los municipios de Tecate, Tijuana y Ensenada.

**Toma de muestra.** Se tomaron en cuenta las variedades de queso elaborados en los centros de muestreo, incluyendo aquellos que llevan un proceso de maduración, y que hayan sido añejados por un periodo de 4 meses o mayor. Por el contrario, fueron excluidas aquellas variedades de quesos que incluyan aditivos y/o conservadores y hayan sido elaborados con leche pasteurizada.

### **Materiales y equipo.**

Tratamiento preanalítico. Las muestras fueron transportadas en una hielera térmica marca Coleman® utilizando bolsas de gel refrigerante marca BOMI De México® previamente congelada, y fueron dispuestas en bolsas estériles de 250 mL Whirl-pack stand-up-Bag® y etiquetadas para su almacenamiento y conservación a temperatura de  $4^{\circ}\text{C} \pm 1$ , realizando mediciones de pH a temperatura ambiente a través de un potenciómetro marca Corning Scholar 425® antes de proceder al análisis.

Tratamiento analítico. Las muestras se manipularon en condiciones de esterilidad haciendo uso de una campana de flujo laminar Envirco® de bioseguridad tipo II. Se aislaron e identificaron bacterias ácidos lácticas como potenciales productores de bacteriocinas de los quesos muestreados, haciendo uso de medios de cultivo diferenciales (BD o Difco). La producción de bacteriocinas se evaluó con la técnica *spot on lawn* y difusión en medio agar en cajas de Petri a  $37^{\circ}\text{C}$ .

**Variables.** Las variables independientes incluyen la temperatura del medio de transporte y conservación, el tipo de queso y pH de la muestra; las variables dependientes consideradas en el estudio son la carga microbiana de la muestra (BAL) y concentración de bacteriocinas. Se realizó un muestreo no probabilístico

por conveniencia, atendiendo a la proximidad de los establecimientos y las variedades de queso comercializadas.

**Análisis de resultados.** Los datos recopilados se agruparon por lugar de muestreo y tipo de queso muestreado, para determinar el efecto de inhibición de las bacteriocinas frente a microorganismos de interés clínico con resistencia antibiótica, se utilizó un tratamiento estadístico en el software SigmaPlot versión 12.0, la interpretación de resultados será a partir del análisis de gráficos y pruebas de ANOVA.

## VIII. PROCEDIMIENTO

---

### **Análisis de mercado**

El análisis de mercado se realizó visitando los centros de comercialización de quesos ubicados en la ruta conocida como “Ruta del Vino” e identificando la variedad de quesos disponibles a la venta.



Imagen 1. Sol de media noche



Imagen 2. Cremería Los globos.



Imagen 3. Fernabella´s. Quesos Brito.



Imagen 4. Valle de Guadalupe.

### **Muestreo de quesos artesanales.**

Después de identificados los lugares de comercialización de quesos artesanales y de acuerdo a los resultados obtenidos, se inició la toma de muestras en el mes de enero de 2016 como se indica en la Tabla 7, donde se incluye el número de muestras de quesos y los comercios correspondientes.

Tabla 7. Diseño de toma de muestras en la Ruta del vino

Comercio	Descripción.	Numero de muestras
Cremería Los Globos	Tienda de quesos Ramonetti y vinos	2
Mercado de la Chica	Quesos del poblado de Necua de Valle de Guadalupe	1
Quesos Real del Castillo	elaborados en Rancho el Mirador	1
Sol de Media Noche	Quesos Valle de Guadalupe	3
Fernabella's	Quesos Brito	1
Rancho Cortés	Valle de Guadalupe	1

### Transporte de la muestra.

Las muestras fueron transportadas en una hielera térmica utilizando bolsas de gel refrigerante previamente congelada, una vez dispuestas en el laboratorio se realizaron cortes de las muestras de queso en condiciones de esterilidad y fueron llevadas a bolsas estériles y etiquetadas para su almacenamiento y conservación a temperatura de  $4 \pm 1$  °C.



Figura 2. Campana de flujo laminar del laboratorio de análisis microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

### **Procesamiento de la muestra.**

Para el procesamiento de la muestra se tomó la porción de queso previamente cortada y fueron procesadas para su análisis por diluciones como lo marca la Norma Oficial Mexicana *NOM-110-SSA1-1994*, Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico, realizando diluciones hasta  $10^{-4}$ . La siembra se realizó por duplicado mediante la técnica de vertido en placas de agar MRS, las cuales fueron incubadas en anaerobiosis por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .



Figura 3. Incubadora del laboratorio de análisis microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

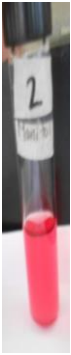








### **Identificación bioquímica de especies de enterobacterias en muestras de quesos artesanales.**

Para el aislamiento de microorganismos se utilizó la *NOM-113-SSA1-1994*, Bienes y servicios. Utilizando Agar Rojo Violeta Bilis (RVBA) marca DIFCO, donde se inoculó 1 mL de cada dilución, con incubación por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después de transcurrido este tiempo, se seleccionaron colonias características para su siembra en medios diferenciales.

### Identificación bioquímica de bacterias Gram positivas productoras de sustancias tipo bacteriocinas.

Para la identificación se seleccionaron las colonias de crecimiento característico y se realizaron pruebas de tinción de Gram y tinción de esporas, para posteriormente ser sembrados en agar Man Rogosa y Sharpe (MRS) por 24 horas en condiciones de anaerobiosis con tensión de oxígeno. Para las pruebas de identificación se tomaron cultivos puros de 24 horas y se realizaron las pruebas de catalasa, oxidasa, Voges Proskauer, hidrolisis de la gelatina, bilis-esculina y asimilación de carbohidratos para la identificación de especies.

Tabla 8. Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias aisladas a partir de quesos.

Manitol	Bilis esculina	Movilidad	Ribosa	Lactosa	Vancomicina	Crecimiento 40°C	pH 9.2	Galactosa
								

### Identificación molecular de cepas aisladas como potenciales productoras de sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas (BLIS).

Para la elección del gen de amplificación se realizó una selección de siete estudios donde se buscó amplificar fragmento de cepa de *Lactococcus lactis* para identificación molecular (Tabla 9).

Tabla 9. Revisión de artículos para selección de *primers*.

Gen	Primers	Cepa	Cita
Gen 16S rRNA	F: 5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3' R: 3'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-5'	<i>Lactococcus lactis</i>	Gunay-Esiyok, Akcelik y Akcelik (2014).
Gen 16S rRNA	FD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' RD1: 5'-TAAGGAGGTGATCCAGGC-3'	<i>Lactococcus lactis</i> Subsp. <i>Lactis A15</i>	El-ghaish, Khalifa y Elmahdy (2016).
Gen 16S rRNA	fD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' rD1: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (Weisburg et al., 1991).	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> .	Petrov <i>et al.</i> (2008).
Gen 16S rRNA.	PA 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3' pE' 5'- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT -3'	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> .	Beasley y Saris (2004).
Gen 16S rRNA.	Y1: 5'- TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGC3' Y25' CCT ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT3'	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> .	Ward, Brown, Davey (1998).
Gen acmA	PALA-4 (5'-CTTCAACA GACAAGTCC) PALA-14 (5'-GATAAATGATTCCAAGC)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> and <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Garde <i>et al.</i> (1999).
Gen 16S rRNA	P1(S) GCGGCGTGCCTAATACATGC P2 (A) TTCCCCACGCGTTACTCACC	<i>Lactococcus</i> 41-60 (P1) y 111-130 (P2)	Klijn, Weerkamp y De Vos (1991).

Se seleccionaron las secuencias P1 y P2 (Klijn, Weerkamp y De Vos, 1991) para identificación del género y Y1 e Y2 (Ward, Brown, Davey, 1998) para identificación de especie y subespecie, siguiendo las metodologías respectivas. La reacción de PCR se efectuó en un termociclador G-Storm Thermal Cyclers GS1, llevando a cabo una desnaturalización inicial, alineamiento, elongación y un periodo de elongación final.

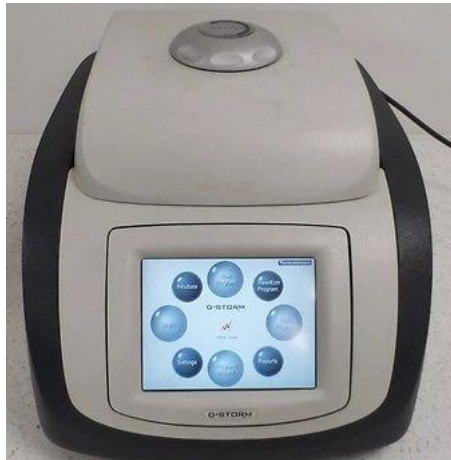


Figura 4. Termociclador GS1 para efectuar reacción de PCR.

#### **Obtención de bacteriocinas parcialmente purificadas.**

Para la obtención de bacteriocinas parcialmente purificadas se utilizó la metodología de Lee *et al.* (2013) con modificaciones en el volumen de cultivo y periodo de centrifugación, donde a partir de 10 mL de un cultivo de BAL de 24h contenidos en tubos cónicos de 50 mL marca AXYGEN Scientific® se centrifugaron a 6,000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga refrigerada a 4°C marca Labnet HermLe® Z300K, para posteriormente retirar los sobrenadantes y adicionar un volumen de sulfato de amonio al 50% del volumen del sobrenadante; posteriormente se dispusieron en tubos cónicos de 15 mL marca Axygen Scientific y se centrifugaron a 3,800 rpm por 15 min para posteriormente coleccionar los precipitados realizando lavados con 200 µl de solución salina reguladora de boratos (SSRB); el procedimiento de precipitación de bacteriocinas con sulfato de amonio se realizó por triplicado.

Los precipitados de proteínas fueron coleccionados y llevados a una electroforesis SDS PAGE para estimar los pesos moleculares de las bacteriocinas parcialmente purificadas. El perfil electroforético de las proteínas se obtuvo según el procedimiento descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), en condiciones desnaturizantes en un gel de poliacrilamida al 15% de concentración. En cada carril se aplicaron 20 µl de proteínas totales y 10 µl de marcador de peso

molecular Novex® Sharp Pre-stained protein standards. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie coloidal G-250 con la técnica *blue-silver Coomassie* para la observación de los perfiles de proteínas.

### **Cuantificación de proteínas por método Bradford**

Se utilizó el método de Bradford, basado en la unión de un colorante, Coomassie blue G-250, donde las proteínas se unen para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Para determinar la concentración de proteína total presente en la muestra se requiere la preparación de una curva estándar a partir de una proteína patrón.

Para trazar la curva de referencia se utilizaron 5 concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) que variaron en 1 µl a los cuales se les adicionó un volumen de agua hasta obtener un volumen final de 300 µl. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro marca Thermo scientific®.

Una vez obtenida la curva de referencia, se midió la absorbancia usando una muestra de 2 µl de proteína parcialmente purificada, 3 mL de reactivo de Bradford y 298 µl de agua destilada, las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm y fueron calculadas de acuerdo a la fórmula de interpolación.

### **Pruebas de susceptibilidad**

**Técnica de difusión en pocillos:** Sobre una base de 10 mL de agar mueller Hinton se colocó la base de una pipeta pasteur de 8 mm de diámetro; se vertió 7 mL de agar BHI blando (0.85%) inoculado con 1 mL del inóculo del patógeno a ensayar. Una vez solidificada la sobrecapa se retiraron las pipetas pasteur de vidrio y en los pocillos formados se depositaron 80 µl de la cepa productora de bacteriocinas; las placas fueron incubadas a 37°C por 12-16 horas. El efecto antagónico se determinó midiendo los diámetros de los halos de inhibición alrededor del pocillo.

**Método Spot-on-lawn:** Cultivos de bacterias ácido lácticas de 24h, fueron goteados sobre la superficie de placas de agar MRS; suspensiones de 16 h de bacterias indicadoras fueron adicionadas a 7 mL de agar BHI blando (0.75%) y la

mezcla fue transferida a las placas de agar MRS, los cuales contenían los cultivos de bacterias ácido lácticas. Las zonas de inhibición fueron medidas después de 24h de incubación a 37°C.

**Método de difusión en disco:** Cultivos con bacterias indicadoras fueron preparados a una concentración de  $10^3$  a  $10^6$  células/mL, de acuerdo al nefelómetro de Mac Farland y absorbancia, fueron adicionados 560  $\mu$ l en 7 mL de agar BHI blando (0.75%) y mezclado. Después este inóculo fue transferido sobre cajas de agar MRS y 30  $\mu$ l de cultivo de bacterias ácido lácticas fue adicionado a discos de papel de 6 mm y puestos sobre la superficie de agar MRS e incubados a 37°C por 24 h en condiciones de aerobiosis. Después de la incubación zonas de inhibición alrededor del disco fueron leídas.

#### **Determinación de la sensibilidad bacteriana de cepas resistentes a bacteriocinas parcialmente purificadas.**

Se evaluó la actividad con el método spot on lawn, utilizando una base de agar al 1.5% y una segunda capa de agar al 0.75% inoculado con el patógeno indicador al 0.5 escala Mac Farland, al 1% v/v, probando 5  $\mu$ l de bacteriocinas parcialmente purificadas y diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  de bacteriocinas en solución salina; de las cajas se incubaron durante 24 horas a 37°C y los datos se reportaron en AU/mL de acuerdo a los valores de dilución más altos en los que se apreció actividad de inhibición.

## IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Para la identificación de los lugares de muestreo, se llevó a cabo un recorrido sobre la ruta conocida como Ruta del Vino en Valle de Guadalupe, B.C. en el mes de febrero, donde se seleccionaron los centros de expendio y variedades de queso comercializadas, así como el número de muestras obtenidas de diferentes variedades de queso (Tabla 10). Las muestras fueron etiquetadas y transportadas de acuerdo a la NOM-109-SSA-1-1994 siguiendo los procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Tabla 10. Distribución del muestreo realizado en la Ruta del Vino (variedades y número de muestras).

Variedad de queso	Número de muestras
Queso Fresco	4
Queso de cabra ahumado y premadurado (45 días)	1
Queso Semiseco	1
Queso panela	1
Queso aireado (oreado)	2
<b>Total de muestras</b>	<b>9</b>

Como se muestra en la Tabla 10, el 44.4% de las muestras analizadas correspondieron a variedades de queso fresco, 22.2% a queso aireado, y el resto (33.4%) a las variedades de queso de cabra, queso semiseco y queso panela.

El pH es un factor fisicoquímico que tiene una influencia considerable en el desarrollo de bacterias ácido lácticas y la producción de bacteriocinas en los productos lácteos, por lo que se realizó la medición del pH de las muestras colectadas mediante un potenciómetro marca Corning Scholar 425<sup>®</sup> calibrado con un coeficiente de correlación de 91% leídas a una temperatura de 25°C, siguiendo la metodología de la norma NMX-F-099-1970. El pH intermedio de las muestras fue de 5.88 (Tabla 11), se encuentra dentro del rango de pH óptimo (5.5-6.2) de crecimiento para bacterias ácido lácticas.

Tabla 11. Resultados de pH de las muestras de queso para su análisis.

Muestra	pH
M1	5.63
M2	5.13
M3	6.42
M4	6.41
M5	5.97
M6	5.84
M7	6.46
M8	6.01
M9	5.05

Los datos obtenidos en la medición de parámetros fisicoquímicos, como lo es el pH, coinciden con los de Succi *et al.* (2016) donde analizaron la variabilidad en perfiles químicos y microbiológicos de quesos de larga maduración, muestrearon 11 quesos con un periodo de maduración de 6 meses con denominación de origen provenientes del sur de Italia, “Caciocavallo”, un queso de pasta semidura. El pH de las muestras se determinó usando un potenciómetro, el pH promedio registrado para las 11 muestras fue de 5.5; los resultados son comparables con García (2006) realizó mediciones de pH en 9 muestras de queso panela, las mediciones fueron de 6.69, 5.50, 6.34, 6.28, 5.96, 5.93, 6.59, 6.19, 5.59; con pH promedio de 6.13. Vásques *et al.* (2012) recolectaron muestras de quesos blancos elaborados artesanalmente con leche cruda de vaca, evaluaron las características fisicoquímicas como el pH, las lecturas de pH registraron una media de 5.68.

Para el análisis de las muestras, se procedió al conteo, aislamiento de bacterias ácido lácticas productoras potenciales de sustancias tipo bacteriocinas, se realizaron diluciones de acuerdo a la NOM-110-SSA-1994, utilizando caldo MRS a pH 6.6, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias con la técnica vertido en placa utilizando el mismo medio (Tabla 12), por duplicado a 36 °C por 24 horas en condiciones de anaerobiosis.

Tabla 12. Selección de cepas productoras de sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas.

Descripción de la muestra	Número de aislamientos de bacterias productoras de bacteriocinas	Registro de inhibición en medio MRS
M1: Queso fresco	Conteo de bacterias lácticas mayor a 250 UFC	-
M2: Queso oreado	>250 UFC	-
M3: Queso fresco	>250 UFC	-
M4: Queso semiseco	>250 UFC	-
M5: Queso fresco	>250 UFC	-
M6: Queso panela	>250 UFC	-
M7: Queso oreado	>250 UFC	-
M8: Queso de cabra	>250 UFC	-
M9: Queso fresco	>250 UFC con 3 aislamientos de bacterias con halos de inhibición registrados	+

Partovi *et al.* (2015) reportan la identificación preliminar y caracterización de BAL en placas de agar MRS que contenían de 25-250 colonias por placa, similar a los conteos de BAL reportados en la Tabla 3.

Se obtuvieron 3 aislamientos de potenciales productores de sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas (BLIS) provenientes de una de las muestras de queso fresco, registrando crecimiento con zonas de inhibición en medio agar MRS (Figura 5).

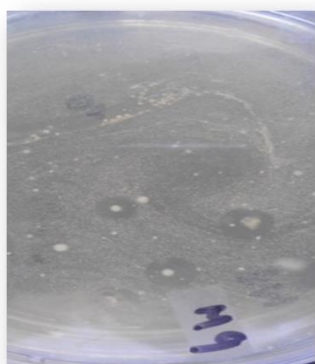


Figura 5. Aislamientos de bacterias productoras potenciales de sustancias tipo bacteriocinas.

Lü *et al.* (2014) estimaron la actividad antimicrobiana de manera preliminar de las BAL por las áreas de inhibición de dos líneas paralelas sobre la superficie de

medio MRS cubierto con agar LB en presencia de patógenos como *E. coli* y *S. aureus*.

Para la identificación bioquímica se analizaron por triplicado las reacciones de hemolisis en agar sangre, sensibilidad a vancomicina, catalasa, oxidasa, fermentación de carbohidratos (lactosa, ribosa, manitol) tinción de Gram, tinción de esporas a través de la técnica de Shaeffer-Fulton y tinción negativa para observación de capsula de acuerdo a la metodología expuesta por Rodríguez *et al.*, (2005), los resultados de la identificación bioquímica se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Identificación bioquímica de aislamientos productores de sustancias BLIS.

Prueba	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3
Movilidad	-	-	-
Indol	-	-	-
Ornitina	-	-	-
MR/VP	-/-	-/-	-/-
Crecimiento a 40°C	+	+	+
Lactosa	+	+	+
Ribosa	+	+	+
Galactosa	+	+	+
Maltosa	+	+	+
Sacarosa	-	-	-
Manitol	-	-	-
Crecimiento en presencia de bilis esculina	+	+	+
Vancomicina	S	S	S
Oxidasa/catalasa	-/-	-/-	-/-
Crecimiento en 4% NaCl	V	-	-
Crecimiento en 6.5% NaCl	-	-	-
CO <sub>2</sub> a partir de citrato	-	-	-
Crecimiento pH 9.2	+	+	+
Gas a partir de citrato	-	-	-

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas para la identificación de los aislamientos fueron contrastados con los biotipos en Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology (2009) y Mac Faddin (2003). Las cepas aisladas se identificaron de acuerdo a los patrones referenciados como *Lactococcus lactis* (*Lactobacillus xylosus*). Millette *et al.* (2006) identificaron bacterias productoras de bacteriocinas aisladas por método de siembra directa y para su identificación se realizaron ensayos de tinción de Gram, motilidad, catalasa y oxidasa como pruebas preliminares y la identificación precisa se realizó a través de extracción de ADN y PCR amplificando el gel 16S ribosomal ARN coincidiendo con las pruebas realizadas para la identificación bioquímica reportadas en la Tabla 13.

Hatzikamari *et al.* (1999) también identificaron principalmente *L. lactis subsp. lactis* como especie predominante de BAL, solo que las variedades de queso provenían de leche cruda de la región occidental de Grecia, constituyendo el 47.9% de las especies de bacterias ácido láctica aisladas de queso.

Adicionalmente, se analizó la carga microbiana de 3 muestras de queso, se comprobó la presencia de especies de enterobacterias (Tabla 14), predominando las especies de *Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter freundii*. En la muestra 1, no se encontró presencia de microorganismos debido a la poca actividad de agua disponible para su desarrollo, característica de los quesos añejos.

Tabla 14. Aislamientos de enterobacterias en muestras de queso.

Muestra	Enterobacterias aisladas
M5	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Citrobacter freundii</i> .
M6	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> .
M9	<i>Citrobacter freundii</i>
M1	<i>Ausencia</i>

Los aislamientos de enterobacterias identificadas a partir de las muestras de queso elaboradas con leche no pasteurizada pueden deberse a contaminación durante el proceso de obtención de la leche y elaboración del queso; Martínez, Montes de Oca y Villoch (2016) argumentan que las bacterias Gram negativas

patógenas en quesos artesanales como *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter spp.* y *Brucella* son de gran importancia desde el punto de vista higiénico (indicadores sanitarios en quesos artesanales).

Partovi *et al.* (2015) analizaron las propiedades químicas y microbiológicas de queso artesanal iraní, donde aislaron e identificaron bacterias ácido lácticas dominantes y el número total de *Enterobacteriaceae* y el conteo de coliformes se utilizó como índice de calidad higiénica, argumentando que entre los principales factores que intervienen en el aumento de los coliformes y las concentraciones de *Enterobacteriaceae* en el queso se encuentran el uso de leche cruda contaminada, la falta de pasteurización, el uso de fermentaciones naturales mal controladas y el tiempo de almacenamiento insuficiente y las condiciones de maduración, lo que también pudo contribuir en la carga microbiana reportada en la Tabla 14, de igual manera la presencia de enterobacterias también pudo verse favorecida por el pH, la concentración de humedad o el periodo de maduración y la actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas.

### **Pruebas de susceptibilidad de *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis* y *Bacillus sporogenes* como productores de bacteriocinas en bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas.**

Se evaluó el efecto de inhibición de las bacteriocinas producidas por *Bacillus sporogenes*, proveniente de un suplemento alimenticio de marca comercial en forma de polvo, *L. delbrueckii subsp. lactis* cepa ATCC 4797 y *Lactococcus lactis* aislado de quesos artesanales para determinar la mejor técnica de expresión de la inhibición entre, la técnica de doble capa (*spot on lawn*) de Cadirci y Citak (2005), la difusión en pocillos (Alvarado y Díaz, 2009) y la difusión en disco (Estrada, Gutiérrez y Montoya, 2005).

En la Tabla 15 se muestran los diámetros de inhibición reportados en cada técnica utilizada, existen diferencias en los rangos de inhibición reportados por los distintos métodos y cepas productoras de sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas.

*Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* resultaron ser más inhibidos por *Lactococcus lactis*, *S. aureus*, *Enterobacter aerogenes* resultaron ser más inhibidos por *B. sporogenes*. El análisis estadístico (ANEXO 3) de los datos reportados en la Tabla 15, muestra normalidad en los datos (P= 0.089), no hay diferencia estadísticamente significativa (P=0.951) entre los halos reportados por los microorganismos tomados como patógeno indicador pero si existe una diferencia estadísticamente significativa (P=0.008) entre los métodos empleados y los patógenos indicadores, así como también entre las bacterias productoras de bacteriocinas y los métodos empleados (P=0.015). El método de doble capa reportó halos de inhibición con diferencia estadísticamente significativa respecto a los métodos de difusión en disco y difusión en pocillos que no mostraron diferencia significativa bajo la prueba de Tukey, por lo que se evaluó como el método con mayor rendimiento en relación a los halos reportados por los patógenos indicadores.

Tabla 15. Análisis de halos de inhibición (mm) reportados por *L. lactis*, *L. delbrueckii* y *B. sporogenes* frente a bacterias patógenas.

Patógeno indicador	<i>L. delbrueckii</i>			<i>L. lactis</i>			<i>B. sporogenes</i>		
	DC	DP	DD	DC	DP	DD	DC	DP	DD
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	15	11	5	10	20	5	15	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	10	10	14	10	5	19	15	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	15	5	11	10	6	17	18	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> .	5	8	9	15	10	5	15	12	5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10	12	10	5	5	8	20	15	6

DC: Método de doble capa. DP: Método de difusión en pocillos. DD: Método de difusión en disco.

Los resultados son comparables con los de Cadirci y Citak (2005) donde realizaron un estudio en el que compararon el efecto antimicrobiano de bacterias ácido lácticas mediante método de difusión en disco y método *spot on lawn* sobre microorganismos Gram (+) y Gram (-), la actividad inhibitoria por el método de *spot on lawn* se consideró el mejor al exhibir mayor actividad de BAL frente a

patógenos indicadores. Los compuestos antimicrobianos, producidos por cultivos lácticos, tienen un gran potencial para controlar el crecimiento de descomposición de alimentos y microorganismos patógenos.

Manzoor *et al.*, (2016) realizaron un estudio donde probaron el efecto de 11 cepas de *Lactobacillus* entre ellos *L. delbrueckii* por el método de difusión en pocillos frente a uropatógenos como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *S. aureus*; *L. delbrueckii* mostró actividad frente a *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli* con halos de 10 a 19mm, mayores a los reportados en la Tabla 15.

### **Identificación molecular de cepas de *L. lactis* aisladas de quesos artesanales por secuenciación del gen 16S rRNA.**

Las técnicas de identificación molecular son comúnmente usadas para la identificación de microorganismos. En particular, la comparación de las secuencias del gen 16S de RNA ribosoma como de los más eficaces y eficientes para la determinación del grado de relación filogenética entre microorganismos;

Se llevó a cabo la identificación molecular utilizando dos pares de *primers* P1(sen): GCGGCGTGCCTAATACATGC y P2(ant): TTCCCACGCGTTACTCACC (Klijn, Weerkamp y De Vos, 1991). Y1: TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGC y Y2: CCTACTGCTGTCCTCCCGTAGGAGT (Ward, Briwn y Davey, 1998), fabricados por Oligos IBT UNAM.

Las condiciones de reacción usadas para el P1 y P2 fueron de amplificación en 30 ciclos por fusión de ADN, primer ciclo de desnaturalización inicial 10min a 95°C, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 54°C por 45 segundos y elongación a 72°C por 1 min y un periodo de elongación final a 72°C por 10 minutos. Para Y1 y Y2 se siguieron un periodo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos y 32 ciclos desnaturalización a 94°C por 45 segundos, hibridación 55°C por 45 segundos y elongación 72°C por 1 minutos y un periodo de elongación final a 72°C por 10 minutos. La reacción de PCR fue efectuada en un termociclador marca G-Storm modelo GS1.

Se preparó una concentración de 10 pmol/μL de cada primer en un volumen de 100μL, utilizando agua libre de nucleasas marca SIGMA Life Science W4502 Lote. RNBC6299, el volumen de los reactivos utilizados en la reacción aparece en la Tabla 16.

Tabla 16. Cantidades para preparación de reacción de PCR

Reactivo	Volumen para reacción (μL)	
	P <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>
Buffer 10x	2.5	2.5
dNTPs	0.5	0.5
Oligos R y F	1.0	1.0
H <sub>2</sub> O	15	15
Taq	0.5	0.5
DNA	3.0	3.0
DMSO (Dimetil sulfóxido):	2.5	2.5

Para la identificación molecular del género se utilizó el par de *primers* P1P2, que amplifica el fragmento de 110 pb, como se muestra en la Figura 1.

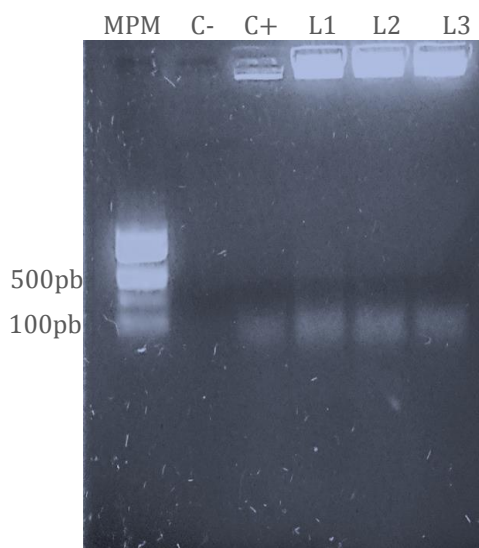


Figura 6. Identificación molecular del género.

Reacción PCR a 54°C. 30 ciclos. Utilizando DNA de pellet colectados por centrifugación de cultivos de BAL (6000 rpm/15 min 4°C). MPM: 100pb DNA Ladder BioLabs. C-: Control negativo. C +: Control positivo, cepa de *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454. L1, L2, L3: *Lactococcus* aislados de queso.

En la Figura 6 se observan las bandas de amplificación de los fragmentos de 110pb del gen 16S rRNA para las cepas ATCC al igual que para los 3 aislamientos de *Lactococcus lactis*.

Para la identificación molecular de la especie se utilizaron el par de *primers* Y1Y2, amplificando el fragmento de 348pb para los 3 aislamientos y la cepa ATCC de *Lactococcus lactis* como se observa en la Figura 7.

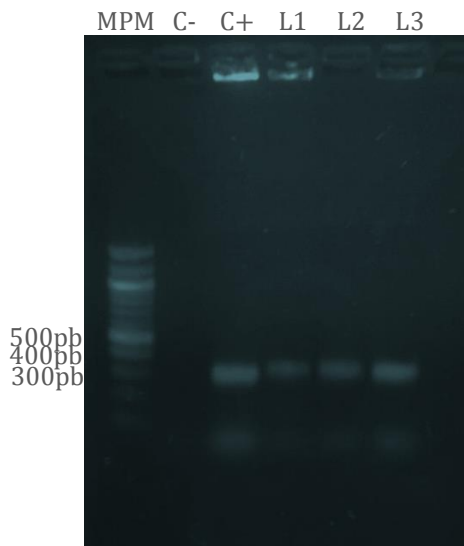


Figura 7. Identificación molecular de especie.  
Reacción PCR a 55°C. 32 ciclos. MPM: 100pb DNA Ladder BioLabs. C-: Control negativo. C +: Control positivo, cepa de *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454. L1, L2, L3: *Lactococcus* aislados de queso.

Los resultados de identificación molecular coinciden con los de Pisano *et al.* (2015) donde realizaron la caracterización molecular de bacteriocinas producidas por 10 cepas de *L. lactis* aisladas de leche de cabra y queso, caracterizadas como productoras de antimicrobianos. Los aislados fueron identificados por pruebas fenotípicas y pruebas basadas en PCR usando secuencias del gen 16S rRNA, usando *primers* Y1 y Y2, que amplifica la región de 348pb conteniendo secuencias, diferenciando la *subespecie lactis* de la *subespecie cremoris*.

### **Pruebas de susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Escherichia coli* betalactamasa de espectro prolongado (BLEE) y *Listeria monocytogenes*.**

Se evaluó el efecto de los 3 aislados de *L. lactis* identificados con técnicas moleculares sobre cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a *meticilina*

(MRSA), *Escherichia coli* betalactamasa de espectro prolongado (BLEE) y *Listeria monocytogenes*, las cepas resistentes fueron obtenidas del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Las metodologías para efectuar las pruebas de susceptibilidad se siguieron de acuerdo a Shokri *et al.*, (2014) y Aween *et al.* (2012) con variaciones en el volumen del inóculo. Los halos de inhibición reportados para las cepas resistentes se concentran en la Tabla 17, donde se muestra que los aislamientos de *Lactococcus lactis* provenientes de queso fresco registraron halos de inhibición mayores a la cepa ATCC para las diferentes especies de patógenos resistentes. El análisis estadístico de los resultados expresados en la Tabla 17 corresponde a datos no normales ( $P=0.021$ ); al realizar la prueba Tukey y el análisis de varianza de 2 vías muestra diferencia estadísticamente significativa ( $P=0.012$ ) entre los efectos de las diferentes cepas *Lactococcus*, pero no existe diferencia estadísticamente significativa entre los patógenos utilizados como indicadores ( $P=0.311$ ). La prueba de Tukey muestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre *Lactococcus lactis* 1 ( $P=0.021$ ) y *Lactococcus lactis* 2 ( $P=0.022$ ) respecto a la cepa de referencia (*Lactococcus lactis* ATCC 4797).

Tabla 17. Halos de inhibición reportados por las 3 cepas de *Lactococcus lactis*.

Patógeno indicador	<i>Lactococcus lactis</i> 1			<i>Lactococcus lactis</i> 2			<i>Lactococcus lactis</i> 3			<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 4797		
<i>E. coli</i> BLEE	16	16	30	19	17	30	21	16	20	12	10	11
MRSA	18	17	21	23	17	24	15	17	20	10	10	8
<i>Listeria monocytogenes</i>	13	20	15	5	20	10	10	20	15	13	12	10

Pisano *et al.* (2014) realizaron un estudio donde ensayaron la actividad de 10 aislamientos de *Lactococcus lactis* sobre microorganismos patógenos usando el método de *spot on lawn*, donde demostraron la actividad inhibitoria sobre cepas de *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium* y *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo el espectro inhibitorio no era el mismo en las cepas ensayadas a pesar de

tratarse del mismo género y especie, lo que muestra cierta variabilidad en la producción de ciertos compuestos inhibidores por cada una de las cepas, influenciadas por condiciones del hábitat o fuente de aislamiento.

### Obtención de bacteriocina parcialmente purificada.

Para la obtención de bacteriocinas parcialmente purificadas se utilizó la metodología de Lee *et al.* (2013) con modificaciones en el volumen de cultivo y periodo de centrifugación. Se prepararon 10 mL de un cultivo de 24 horas de los tres aislamientos de *Lactococcus lactis* y de la cepa de referencia, se separaron en una centrifuga refrigerada a 4 °C marca Labnet HermLe Z300K, a 6000rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron colectados y dispuestos en tubos cónicos de 15 mL, se adicionó un volumen de sulfato de amonio concentrado al 50% del volumen del sobrenadante y fueron centrifugados a 3800 rpm por 15 minutos; los precipitados fueron colectados y disueltos en 200 µl de solución reguladora de boratos.

El perfil electroforético de las proteínas se obtuvo según el procedimiento descrito por Laemmli (1970), en condiciones desnaturalizantes en un gel de poliacrilamida al 15% de concentración. En cada carril se aplicaron 20 µg de proteínas totales. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie coloidal G-250 con la técnica *silver blue* para la observación de los perfiles de proteínas (Figura 8).

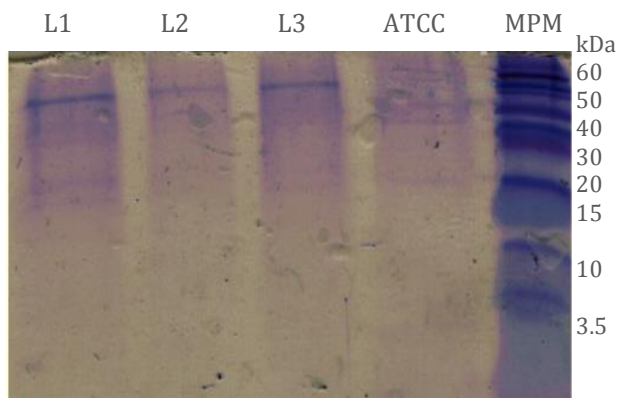


Figura 8. Perfiles de proteínas.

Perfiles de proteínas obtenidas por SDS-PAGE de C+: *Lactococcus lactis* ATCC. L1,L2,L3: *Lactococcus* aislados de quesos. MPM: Marcador de peso molecular Novex® Sharp Pre-stained protein standards. Gel de poliacrilamida 15%

El perfil electroforético (Figura 8) muestra bandas de proteínas en los geles, donde se observa cierta similitud entre las proteínas de los tres aislamientos de *Lactococcus lactis* y la cepa ATCC de *Lactococcus*. Fue posible observar bandas de proteínas de peso molecular alrededor de 40 kDa comunes en los tres aislamientos, fragmentos de 30, 20 y 15 kDa para el aislamiento de *Lactococcus lactis* L1, estos últimos dos fragmentos fueron distintivos para respecto al resto de los perfiles proteicos mostrados por el resto de los aislamientos y para la cepa ATCC.

Los resultados de los pesos moleculares de proteínas de *L. lactis* usando SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes (Figura 8) son similares a los de Guo *et al.* (2008) para *Lactococcus lactis* aislada de col en escabeche, donde mostraron una banda con una masa molecular de alrededor de 53 kDa, después de ser purificada por cromatografía.

#### **Cuantificación de proteínas por método de Bradford.**

Para la cuantificación de proteínas se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como proteína de referencia para la formación de una curva estándar igual que en los estudios de Guo *et al.* (2008). Para trazar la curva de referencia se utilizaron 5 concentraciones de BSA que variaron en 1  $\mu$ L a los cuales se les adicionó un volumen de agua hasta obtener un volumen final de 300  $\mu$ L. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro marca Thermo scientific® (Tabla 18).

Tabla 18. Estandarización de la curva patrón utilizando albúmina como proteína de referencia.

µg de proteína	µl de albúmina	µl de agua	Volumen total (µl)	Absorbancia a 595nm
0	0	300	300	0
1	1	299	300	0.0025
2	2	298	300	0.009
3	3	297	300	0.033
4	4	296	300	0.056
5	5	295	300	0.080
6	6	294	300	0.094

Una vez obtenida la curva de referencia (Gráfico 1), cuya linealidad se ajusta al 99.14% en el 98.29% de los casos, se midió la absorbancia usando una muestra de 2 µl de proteína parcialmente purificada, 3 mL de reactivo de Bradford y 298 µL de agua destilada, las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm y fueron calculadas de acuerdo a la fórmula de regresión lineal obtenida a partir de los datos de la curva de referencia:  $y=49.607x +1.2305$  donde "X" representa los valores de absorbancia y "Y" representa los valores los µg de proteína.

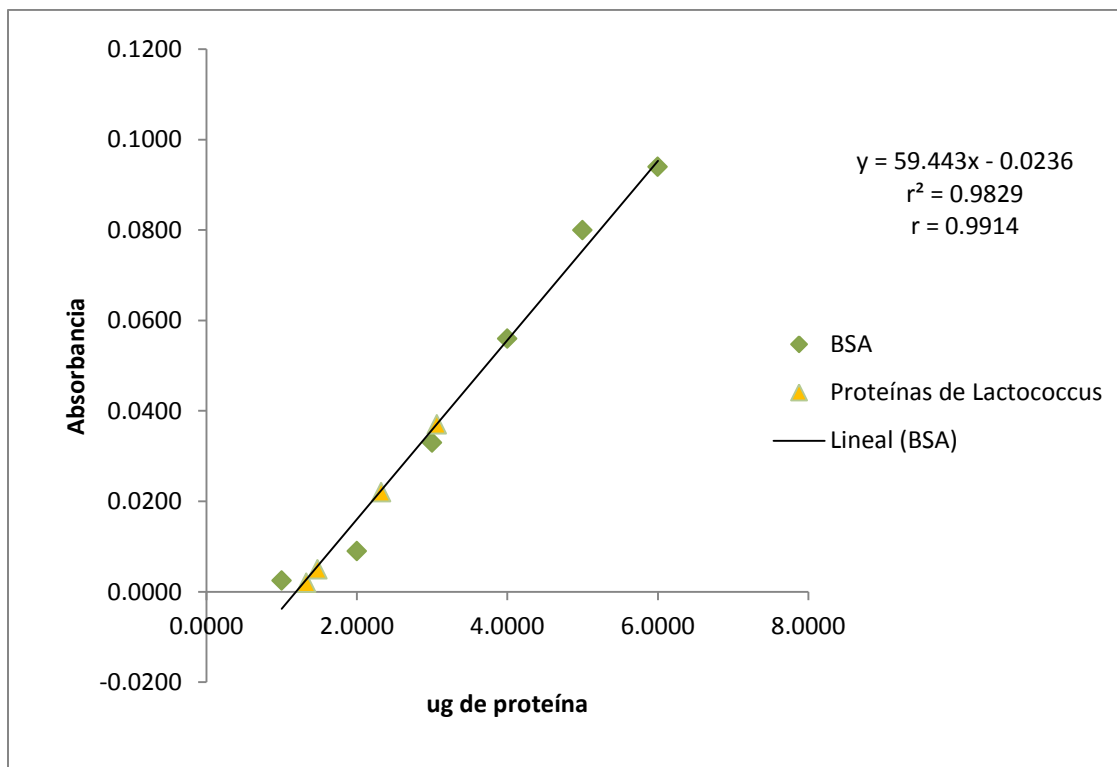


Gráfico 1. Cuantificación de proteínas por método Bradford.

En la Tabla 19 se muestra la cuantificación de proteínas a partir del método Bradford, donde se muestra variaciones en el contenido de proteínas de cada cepa productora de bacteriocinas, a su vez se muestra que las mayores concentraciones de proteínas se presentan en el primer aislamiento de *Lactococcus lactis* (L1) y el contenido de proteína más bajo se reporta en la cepa ATCC de *Lactococcus lactis*.

Tabla 19. Cuantificación de proteínas utilizando método Bradford.

Cepa	Agua ( $\mu$ l)	Proteína ( $\mu$ l)	Reactivo de Bradford (mL)	Absorbancia a 595nm (A)	Cantidad de proteína ( $\mu$ g)
ATCC	298	2	3	0.002	1.329714
L1	298	2	3	0.037	3.065959
L2	298	2	3	0.005	1.478535
L3	298	2	3	0.022	2.321854

Guo *et al.* (2008) estimaron las concentraciones de proteínas de *L. lactis* por el método Bradford, utilizando como reactivo de ensayo Coomassie Protein con albúmina de suero bovino como patrón. La cantidad de enzima obtenida en la etapa final de purificación a través de cromatografía de Sephacryl-S-300HR fue de 0.49 mg, obtenida de 8.04 mg de proteína a partir de la purificación con sulfato de amonio, los resultados de la Tabla 19, muestran menores rendimientos a los de Guo *et al.* (2008). Mavric *et al.* (2014) también reportan cuantificación de proteína de *Lactobacillus gasseri* K7 por precipitación con sulfato de amonio siendo de 1.72 mg, las variaciones en la cantidad de proteína obtenida pueden reportar variaciones de acuerdo al volumen del cultivo utilizado para precipitar las proteínas.

#### **Pruebas de susceptibilidad con bacteriocinas parcialmente purificadas.**

Se evaluó la inhibición de patógenos resistentes como *E. coli* Betalactamasa de espectro prolongado, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Pseudomonas aeruginosa* frente a las bacteriocinas parcialmente purificadas de los tres aislamientos de *Lactococcus lactis* y la cepa de referencia ATCC, siguiendo la metodología expuesta por Yousef y Carlstrom (2003), manejando diluciones de la bacteriocinas hasta  $10^{-3}$ , donde se mostró efecto sobre *E. coli* y *S. aureus* pero no así para *Pseudomonas aeruginosa*, las bacteriocinas parcialmente purificadas de la cepa de referencia no mostraron actividad sobre ninguno de los patógenos utilizados como indicadores. Los resultados se muestran en la Tabla 20, expresados en actividad relativa de la bacteriocina (AU) por volumen (mL),

obtenidos a partir de la fórmula  $\frac{AU}{ml} = \frac{1}{DF_i} \left[ \frac{1000}{volumen(\mu l)} \right]$  donde  $DF_i$  representa la

dilución más alta en la que se presenta inhibición. Los resultados de actividad obtenidos para *Lactococcus lactis* (L1, L2, L3) son comparables con los reportados por Bendjeddou *et al.* (2012) utilizando los sobrenadantes de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* donde las actividades registradas (AU) son de 40,000 registrando actividad sobre *E. coli*. A su vez Lee *et al.* (2013) reportan actividad de la bacteriocina purificada KU24 de *Lactococcus lactis* aislada de *Kimchi*, un

alimento fermentado, donde reportan actividad de hasta 800 AU/mL para *S. aureus* resistente a meticilina, cuyos datos podrían sugerir cambios en las actividades de las bacteriocinas reportadas en la Tabla 20 una vez purificadas.

Tabla 20. Actividad de las bacteriocinas parcialmente purificadas.

Patógeno indicador	Temperatura (°C)	Bacteriocina (AU/mL)			
		ATCC	L1	L2	L3
<i>S. aureus</i> resistente a meticilina	35	0	20,000	20,000	20,000
<i>E. coli</i> BLEE	35	0	20,000	20,000	20,000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35	0	0	0	0

## X. CONCLUSIONES

---

- El 44.44% de las muestras analizadas correspondieron a variedades de queso fresco, 22.2% a queso aireado, y el resto (33.4%) a las variedades de queso de cabra, queso semiseco y queso panela.
- El pH promedio de las muestras fue de 5.88, el cual se encuentra dentro del rango de pH óptimo (5.5-6.2) de crecimiento para bacterias ácido- lácticas y por ende contribuye a la producción de metabolitos, entre ellos bacteriocinas por parte de bacterias fermentadoras.
- El conteo de bacterias ácido lácticas en las muestras fue mayor a 250 UFC con 3 aislamientos de bacterias potencialmente productoras de bacteriocinas provenientes de una muestra de queso fresco, identificadas como *Lactococcus lactis* (*Lactobacillus xylosus*) por perfil bioquímico.
- Se comprobó la presencia de especies de enterobacterias en muestras de quesos artesanales, predominando las especies de *Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter freundii* revelando el mal manejo en los procesos de elaboración de quesos o existencia de contaminación cruzada, incluso la utilización de leche no pasteurizada.
- La identificación molecular en los 3 aislamientos potenciales productores de bacteriocinas amplificaron el de fragmento de 110 pb característico del género *Lactococcus* y el fragmento de 348 pb del gen 16S rRNA para la identificación de especie *lactis subsp. lactis*, comprobando por perfil genómico la existencia de 3 aislamientos de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, considerados como potenciales productores de bacteriocinas.
- Se demostró actividad inhibitoria de los 3 aislamientos de *Lactococcus lactis subespecie lactis* sobre cepas resistentes a antibióticos probadas bajo el método *spot on lawn* con mayor actividad que la cepa ATCC de referencia, lo que demuestra la capacidad de producción de metabolitos

capaces de producir inhibición por competencia de acuerdo a la fuente de aislamiento y condiciones del entorno.

- Las mayores concentraciones de proteínas se obtuvieron en el primer aislamiento de *Lactococcus lactis* (L1) y el contenido de proteína más bajo fue reportado en la cepa de referencia, lo que coincide con el perfil de proteínas a través de SDS-PAGE.
- Las pruebas de inhibición a través del método *spot on lawn* utilizando las bacteriocinas parcialmente purificadas de los aislamientos de *Lactococcus lactis* muestran actividad sobre patógenos resistentes a antibióticos como *E. coli* betalactamasa de espectro prolongado y *S. aureus* resistente a *meticilina*, no así para *Pseudomonas aeruginosa*, lo que prueba la especificidad reportada de las bacteriocinas de acuerdo a la bacteria productora y la fuente de aislamiento. La actividad reportada sobre cepas resistentes a antibióticos promueve la utilidad de las bacteriocinas obtenidas como posible terapia antibiótica, incluso probando su actividad a través de análisis in vitro y in vivo de las bacteriocinas una vez purificadas por métodos cromatográficos.

## XI. RECOMENDACIONES

---

- ❖ El estudio favorece el uso de nuevas fuentes naturales para el desarrollo de nuevos antibióticos útiles en el tratamiento de patógenos asociados a resistencia antibiótica, donde el uso de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas representa una alternativa viable, eficiente y presupone la reducción de costos para las industrias farmacéuticas por sus altos rendimientos y actividad reportada, además de no existir resistencia reportada ante este tipo de compuestos de naturaleza protéica.
- ❖ Se establece necesario el seguimiento a la normativa para la elaboración de quesos artesanales con el fin de garantizar la calidad higiénico-sanitaria de los productos elaborados.
- ❖ El consumo de lácteos y productos fermentados, a través de la producción de metabolitos por parte de bacterias ácido lácticas influye de manera favorable en la salud, favoreciendo la regulación de la microbiota intestinal, mejorando las propiedades de la micro flora nativa, e incluso estimulando el sistema inmunológico.
- ❖ Se promueve la búsqueda de nuevas fuentes de aislamiento de bacteriocinas que representen un valor añadido en productos regionales de alto valor nutricional y de consumo general.

## XII. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.

---

Dentro de la línea de investigación de bacteriocinas localizadas para *Lactococcus lactis* dentro de esta investigación se sugieren los siguientes estudios para promover su utilidad en el área de fármacos biotecnológicos.

- Purificación de proteínas mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) siguiendo la metodología de Piper *et al.* (2009).
- Caracterización fisicoquímica de las proteínas, analizando el efecto de pH, temperatura y enzimas sobre la actividad de la proteína.
- Estudios clínicos, analizando actividad *in vitro* e *in vivo* frente a patógenos resistentes.
- Secuenciación de aminoácidos de las proteínas localizadas (mapeo peptídico).
- Construcción de un vector de expresión para las proteínas codificadas en *Lactococcus lactis*.
- Análisis de electrotransferencia utilizando la técnica Western Blot.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

---

- Abo-Amer AE. Molecular characterization of antimicrobial compound produced by *Lactobacillus acidophilus* AA11. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2007; 54: 107-119.
- Allen, H. K. Trachsel, J. Looft, T. Casey, T.A. Finding alternatives to antibiotics. *Annals of the New York Academy Sciences*. 2014; 1323: 91-100.
- Alvarado-Rivas CC. y Díaz-Rivero CG. Efecto antagónico de *Lactobacillus plantarum* aislado de pastizal de finca lechera. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 2009; 10(1).
- Amorocho CC. *Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja guirra*. (Tesis Doctoral). Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 2011.
- And CH. y Hoover DG. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2003. 2: 82-100
- Aunpad R, Na-Bangchang K, Pipatsatitpong D. Bacteriocins with anti-MRSA activity produced by water and soil isolated bacteria. *Annals of Microbiology*. 2007; 57(1):9-14.
- Aween MM, Hassan Z, Muhiaddin BJA, Eljamel YA, Al-Mabrok ASW, Lani MN. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from honey marketed in Malaysia against selected multiple antibiotic resistant (MAR) Gram-Positive bacteria. *Journal of Food Science*. 2012; 77(7): M364-M371.
- Badui S. *Química de los alimentos*. 4ª ed. Editorial Pearson. México; 2006.
- Barefoot S, Klaenhammer T. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Env. Microbiology*. 1983; 45(6): 1808-1815.
- Batdorj B, Dalgalarondo M, Choiset Y, Pedroche J, Métro F, Pré vost H, Chobert JM y T. Haertlé. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology*. 2006; 101: 837-848.
- Battro P. *Quesos artesanales. Historia-Descripción-Elaboración*. 1ª ed. Editorial Albatros Saci. Buenos Aires, Argentina; 2010.
- Beasley S y Saris P. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Applied and environmental microbiology*. 2004; 70(8): 5051-5053.
- Benavides SA. (Universidad Simón Bolívar coordinación de posgrado en Ciencias de los alimentos y nutrición). Identificación de bacterias potencialmente

- productoras de aminos biógenas aisladas de queso blanco venezolano. Tesis de maestría. Caracas, Venezuela. 2010.
- Bendjeddou K, Fons M, Strocker P, Sadoun D. Characterization and purification of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* BMK2005, an intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens. *World J. Microbiol Biotechnol.* 2012; 28:1543-1552.
- Beresford TP, Fitzsimons NA., Brennan NL, Cogan TM. Recent advantages in cheese microbiology. *International Dairy Journal*; 2001, 11: 259-274.
- Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. 2<sup>a</sup> ed. Vol. 3. The Firmicutes. Springer. 2009. Pág. 484.
- Beristain B, Palou E, López M. Bacteriocinas: Antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos.* 2012; 6(2), 64-78.
- Bierbaum G, Sahl HG. Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch Microbiol.* 1985; 141:249–254
- Brotz H, Beirbaum G, Markus A, Moliter E and Sahl HG, Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism?. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39:714–719.
- Bustamante S. Protocolo para la evaluación/comparación de la actividad antimicrobiana antibióticos genéricos y antibióticos innovadores, frente a patógenos clínicos. (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2015.
- Cadircil BH y Citak S. A comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition.* 2005; 4(4): 237-241.
- Camargo I, Gómez S y Salazar V. Impacto de las bacteriocinas, importancia como preservantes en la industria de alimentos. Centro de Investigación y Desarrollo. *Teoría y Praxis Investigativa.* 2009; 4(2), 27-31.
- Cavera V, Arthur T, Kashtanov D, Chikindas M. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2015; 46(5): 494-501.
- Chen H y Hoover DG. Bacteriocins and their food applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2006; 2:82–100.
- Cotter PD, Hill C y Ross RP. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews of Microbiology.* 2005; 10(3): 777-788.

- Cristóbal R. *Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2008.
- D´ Angelis CEM, Polizello ACM, Nonato MC, Spadaro ACC, De Martinis ECP. Purification, characterization and N-terminal amino acid sequencing of sakacin 1, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* 1. *Journal of food Safety*. 2008; 29: 636-649.
- De la Fuente N y Barboza J. Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria*. 2009; 20(1), 43-52.
- De la fuente, M. *Biosíntesis y actividad de bacteriocinas producidas por cepas mexicanas de Bacillus thuringiensis con potencial aplicación como bioconservadores en alimentos*. (Tesis doctoral). Universidad autónoma de Nuevo León. 2009.
- De Vuyst L y Leroy F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, purification and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2007; 13: 194-199.
- Del Castillo R y Mestres J. *Productos lácteos. Tecnología*. Universidad Politécnica de Catalunya. 1ª ed. Editorial Barcelona. 2004.
- Drider D, Bendali F, Naghmouchi K, Chikindas M. Bacteriocins: not only antibacterial agents. *Probiotics & Antimicro. Prot*. 2016; 8:177-182
- Durán M, Montero P, Flores W, Franco de la Hoz V y Coneo R. Evaluación higiénico-sanitaria y acción antagónica de cepas de lactobacilos comerciales frente a microorganismos patógenos (*Escherichia coli*) presentes en el queso de capa del municipio de Mompox. *Revista Científica FCV-LUZ*. 2010; (20)3: 312-317.
- Elayaraja S, Annamalai N, Mayavu P, Blasubramanian T. Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014; 4(Suppl 1): S305-S311.
- El-ghaish S, Khalifa M y Elmahdy A. Antimicrobial impact for *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A15 and *Enterococcus faecium* A15 isolated from some traditional egyptian dairy products on some pathogenic bacteria. *Journal of Food Biochemistry*. 2017; 41: e12279.
- Esnaola LVM. Queso 2013: aumentan la producción, las importaciones y el consumo. *Oficina de Estudios y Políticas Agrarias*. Chile. 2013; 2-13.
- Espinoza MA, De la Torre BM, Salinas FM, Sánchez PV. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expanden

- en los mercados del distrito de ICA, Enero-Marzo 2003. *Rev peru med exp Salud pública*. 2004; 21(2): 71-75.
- Estrada MAC, Gutiérrez RLA, Montoya COI. Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* contra *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*. *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín*. 2005. 58(1): 2601-2609.
- Food and Agriculture Organization (FAO). Fichas técnicas. Procesados de lácteos. Queso fresco pasteurizado. 2017.
- Food and Agriculture Organization (FAO). Producción y productos lácteos. Portal lácteo. Leche y productos lácteos. 2014.
- Food and Agriculture Organization (FAO). The FAO action plan on antimicrobial resistance 2016-2020. Supporting the food and agriculture sectors in implementing the Global Action Plan on Antimicrobial Resistance to minimize the impact of antimicrobial resistance. Roma. 2016.
- Froc J. Balade au pays des fromages. Les traditions fromagères en France. Editorial Quae. 2006.
- Garde S, Babin M, Gaya P, Nuñez M y Medina M. PCR amplification of the gene *acmA* differentiates *Lactococcus lactis subsp. lactis* and *L. lactis susp. cremoris*. *Applied and environmental microbiology*. 1999; 65(11): 5151-5153.
- García GM, Quintero RR, López –Munguía CA. *Biotecnología alimentaria*. 1ª ed. Editorial Limusa. México; 2004.
- Gasparin Clarvalho JD, Hanada Viotto W. y Yoshiteru KA. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control*. 2005; XXX: XXX-XXX.
- Gérvas J. (2000). La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. *Atención Primaria*. 2000; 25(8): 589-596.
- Gobierno del estado de Baja California. *Plan Estatal de Desarrollo Baja California. Diagnóstico estratégico*. Informe 2014-2019. 2015.
- Gunay-Esiyok, O., Akcelik, N. y Akcelik, M. Identification of Genomic Heterogeneity among *Lactococcus lactis* Strains by Plasmid Profiling, PFGE and 16S rDNA sequence analysis. *Polish Journal of Microbiology*. 2014; 63(2): 157-166.
- Guo Y, Pan D, Zeng X, Tanokura M. Purification and characterization of CEP from *Lactococcus lactis spp. lactis*. *Food Chemistry*. 2009; 112: 533-538.
- Hassan M, Kjos M, Diep DB y Lotfipour. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. Review article. *Journal of Applied Microbiology*. 2012; 13: 723-736.

- Hatzikamari M, Litopoulou- Tzanetaki E, Tzanetakis N. Microbiological Characteristics of Anevato: a traditional Greek cheese. *Journal of Applied Microbiology*. 1999; 87: 595-601.
- Hermanns G, Funck GD, Tamiozzo SJ, Queiroz PJ, Brandelli A, Pererira Dos Santos R. Evaluation of probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from artisan cheese. *Journal of food safety*. 2014; 34: 380-387.
- Hernández A. *Microbiología industrial*. 1ª ed. EUNED editorial. Costa Rica; 2003.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). *Boletín de información oportuna del sector alimentario*. 2014; 347.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). *El sector alimentario en México*. Aguascalientes, México. 2008.
- Jacobsen CN, Rosenfeldt-Nielsen V, Hayford AE, Moller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, *et al.* Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus spp.* by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in human. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; 65: 4949–56.
- Karska-Wysocki B, Bazo M, Smoragiewicz W. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiological Research*. 2009; 165: 674-686.
- Kaur G, Singh TP, Malik RK, Bhardwaj A, De S. Antibacterial efficacy of nisin, pediocin 34 and enterocin FH99 against *L. monocytogenes*, *E. faecium* y *E. faecalis* and bacteriocin cross resistance and antibiotic susceptibility of their bacteriocin resistant variants. *J. Food Sci Technol*. 2014; 51(2): 233-244.
- Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 1993; 12(1-3): 39-85.
- Klijn N, Weerkamp A y De Vos W. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and environmental microbiology*. 1991; 57(11): 3390-3393.
- Kramer NE, Hasper HE, Patrick TC, Bogaard VD, Morath S, Kruijff B, Hartung T, Smid E, Breukink E, Kok J y Kuipers OP. Increased D-alanylation of lipoteichoic acid and a thickened septum are main determinants in the nisin resistance mechanism of *Lactococcus lactis*. *Microbiology*. 2008; 154:1755–1762
- Kuipers A, Rink R, Moll GN. Genetics, Biosynthesis, Structure, and mode of action of lantibiotics. Chapter 9. 2011. In: D. Drider and S. Rebuffat, ed., 1st ed. Pag. 147.

- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-685. <http://www.bio-protocol.org/e80>
- Larrea, H., Flórez, M. y Huapaya, Y. (2007). Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I. *Revista Horizonte Médico*. 2007; 7(1): 16-22.
- Lee NK, Han EJ, Han KJ, Paik HD. Antimicrobial Effect of Bacteriocin KU24 produced by *Lactococcus lactis* KU24 against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of food science*. 2013; 78(3): 465-469.
- López MJ, Ochoa A, Santoyo G, Anaya J, Medina E, Martínez M y Loeza P. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2008; 39 (3), 49-57.
- Lü X, Yi L, Dang J, Dang Y, Liu B. Purification of novel bacteriocin produced by *Lactobacillus coryneformis* MXJ 32 for inhibiting bacterial foodborne pathogens including antibiotic-resistant microorganisms. *Food control*. 2014; 46: 264-271.
- Lujan D. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad: aspectos epidemiológicos y moleculares. *An Fac med*. 2013; 74(1):57-62.
- Mac Faddin, J. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial médica Panamericana. Pág. 498.
- Manzoor A, Ul-Haq I, Baig S, Qazi JI, Seratlic S. Efficacy of locally isolated lactic acid bacteria against antibiotic-resistant uropathogens. *Jundishapur J Microbiology*. 2016; 9(1): e18952.
- Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miraris Gh, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E. Probiotic potential of *Lactobacillus strains* isolated from dairy products. *International Dairy Journal*. 2006; 16: 189–99.
- Martínez B. Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos: nisina Z y lactococina 972. (Tesis de doctorado), Instituto de productos lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Oviedo. 1996.
- Martinez VA, Montes de Oca N, Villoch CA. Determinación de indicadores sanitarios en quesos artesanales. *Rev. Salud Anim*. 2016. 38 (1): 64-66
- Mavric A, Tompa G, Trmcic A, Rogelj I, Matijasic B. Bacteriocins of *Lactobacillus gasseri* K7- Monitoring of gassericin K7A and B genes expression and isolation of an active component. *Process Biochemistry*.
- Medina AM. La resistencia a los antibióticos y la falta de interés de la industria farmacéutica. *Infectio*. 2014; 18 (2): 35-36.

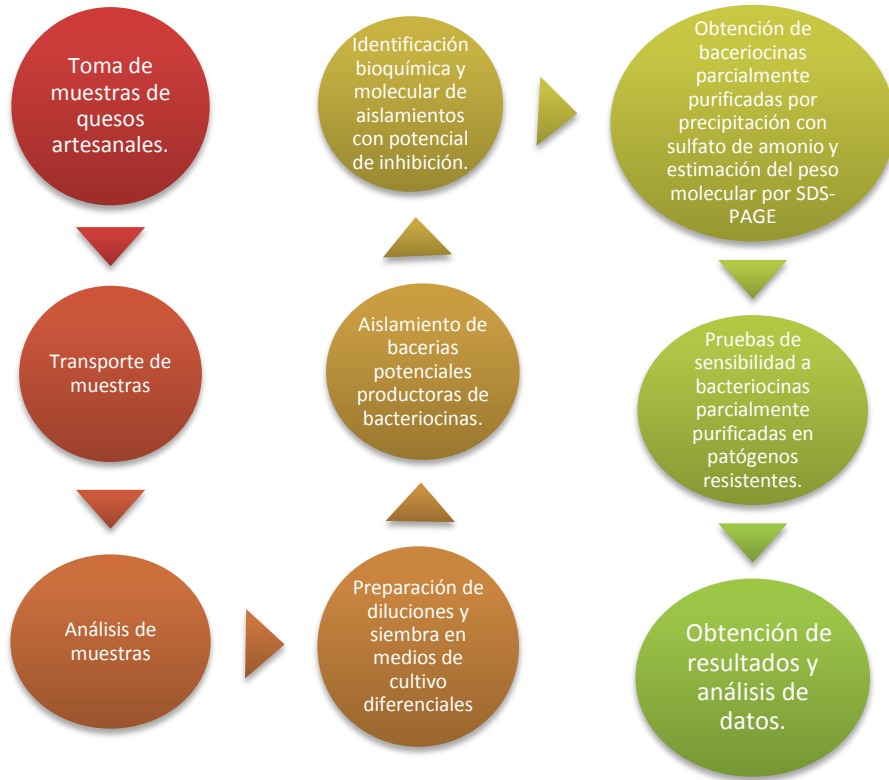
- Millette M., Dupont C., Archambault D., Lacroix M. Partial characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. *Journal of Applied Microbiology*. 2006. 102: 274-282.
- Mondragón G, Escalante P, Osuna J, Ibarra V, Morlett J, Aguilar C y Rodríguez R. Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 2013; 1(59): 64-70.
- Monroy M, Castro T, Fernández F y Mayorga L. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*. 2009; 1 (73): 63-72.
- Morris SL, Walsh RC, Hansen JN. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *J Biol Chem*. 1984; 259:13590–13594.
- Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA1-1993, Bienes Y Servicios. Quesos De Suero. Especificaciones Sanitarias. Recuperado de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/035ssa13.html>
- Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- Normas Mexicanas. NMX-F-099-1970. Método de prueba para la determinación de pH en quesos procesados. Dirección General de Normas. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-099-1970.PDF>
- Olivares, J. En Baja California, la primera cava de piedra para quesos en América. *La Jornada. Gastronomía*. (24 de abril de 2008). Recuperado de: <http://www.jornada.unam.mx/2008/04/24/index.php?section=gastronomia&article=a08n1gas>
- Organización Mundial de la Salud. Centro de prensa. Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva. Septiembre 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Organización Mundial de la Salud. Inocuidad de los alimentos. 2014. Recuperado en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
- Ozen A, Pons A y Tur J. Worldwide consumption of functional foods: a systematic review. *Nutrition Reviews*. 2012; 70 (8): 472-481. International Life Sciences Institute.
- Parra R. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Review. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 2010; 8(1): 94-105.

- Partovi R, Gandomi H, Akhondzadeh BA, Noor N, Nikbakht BG, Kargozari M. Microbiological and chemical properties of siahmazgi cheese, an Iranian artisanal cheese: isolation and identification of dominant lactic acid bacteria. *Journal of food processing and preservation*. 2015; 39: 871-880.
- Pastor-sánchez R. Alteraciones del nicho ecológico: resistencias bacterianas a los antibióticos. *Gaceta Sanitaria*. 2006; 20(Supl. 1): 175–181.
- Pérez, L.. Tradición e innovación de quesos en Baja California. *Diario ZETA*. (15 de Febrero de 2013) Recuperado de: <http://zetatijuana.com/noticias/bc-avanza/14412/tradicion-e-innovacion-de-quesos-en-baja-california>.
- Petrov K, Urshev Z, Petrova P. L(+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis susp. lactis* B84. *Food microbiology*. 2008; 25: 550-557.
- Piper C, Draper L, Cotter P, Ross P, Hill C. A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 64(3): 546-551.
- Pisano MB, Fadda ME, Melis R, Ciusa ML, Viale S, Deplano M, Cosentino S. Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. *Food control*. 2015; 51: 1-8.
- Planzer S.B, Da Cruz A.G, Sant´ A, Silva R, Moura MRL, De Carvalho L.M.J. Food Safety knowledge of cheese consumers. *Food Microbiology and Safety. Journal of Food Science*. 2009. 74(1): M28-M30.
- Pomeón T y Cervantes F. El sector lechero y quesero en México de 1990 a 2009: entre lo global y local. Universidad Autónoma de Chapingo. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM). 2010; 89: 10-46.
- Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO). Calidad de Quesos. *Revista del Consumidor*. 2000; 278: 2-17.
- Quezada I. Tendencias mundiales del consumo de quesos y su comercialización. *Agrimundo. Inteligencia competitiva para el sector Agroalimentario*. 2013; 3: 1-4.
- Riaz S, Nawaz K, Hasnain S. Bacteriocins produced by *L. fermentum* y *L. acidophilus* can inhibit cephalosporin resistant *E. coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010; 41: 643-648.
- Rodríguez E, Gamboa M, Hernández F y García J. *Bacteriología General. Principios y prácticas de laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica. 2005. Pág. 76.

- Saavedra L y Sesma F. Purification techniques of bacteriocins from lactic acid bacteria and other Gram-positive bacteria. Capítulo 7. (2011). In: D. Drider and S. Rebuffat, ed., 1st ed. Pag 99.
- Sánchez J. Aspectos higiénicos, seguridad y potencial biotecnológico de Enterococos aislados de ánades reales (*Ana platyrhynchos*). Caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas y producción heteróloga en diversos hospedadores. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. 2008.
- Schillinger U, Lucke F. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiology*. 1989; 55: 1901-1906.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México (SAGARPA). Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011-2020. Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios SAGARPA. 2009.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Panorama de la Leche en México. 2016.
- Shokri D, Zaghian S, Khodabakhsh F, Fazeli H, Mobasherizadeh S, Ataei B. Antimicrobial activity of a UV-stable bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Enterococcus faecium* strains DSH20 against vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) strains. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2013; 47(5):371-376.
- Snyder A y Worobo R. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *Society of Chemical Industry*. 2014; 92: 28-44.
- Sourabh A, Kanwar SS, Sharma OP. Antagonistic potential indigenous bacterial probiotics of Western Himalayas against antibiotic-resistant bacterial pathogens. *Current Science*. 2011; 101(10): 1351-1356.
- Succi M, Aponte M, Tremonte PM, Niro S, Sorrentino E, Lorizzo M, Tipaldi L, Pannella G, Panfili G, Fratianni A, Coppola R. Variability in chemical and microbiological profiles of long-ripened Caciocavallo cheeses. *American dairy science association. J. dairy Sci*; 2016. 99:9521-9533.
- Svetoch EA, Eruslanov BV, Kovalev YN, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Levchuk VP, Fursova NK, Perelygin VV, Stepanshin YG, Teymurasov M G, Seal BS, Stern NJ. Antimicrobial activities of bacteriocins E 50-52 and B 602 against antibiotic-resistant strains involved in nosocomial infections. *Probiotics & Antimicro. Prot*. 2009; 1: 136-142.

- Todorov S, Dicks L. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *J. Basic Microbiology*. 2005; 45 (4): 312-322.
- Tükel C, Avsaroglu MD, Simsek O y Akcelik M. Isolation and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MC38. *Journal of Food Safety*. 2007; 27: 17-29.
- Vanegas LMC, González GLN, Martínez AJ, Vives HMC, Arévalo MSA. Acción bactericida de bacterias ácido lácticas contra *Listeria monocytogenes* serotipo 4b. *Alimentos hoy, Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2012. 21(25): 90-98
- Vasquez N, Durán L, Sánchez C, Acevedo I. Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso blanco a nivel de distribuidores, estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Trop.*, 2012; 30 (3):217-223.
- Vazquez-Fontes C, Sanchez-Vera E, Castelan-Ortega O. y Espinoza-Ortega A. Microbiological quality of artisan-made mexican botanero cheese in the central highlands. *Journal of Food Safety*; 2010, 30:40-50
- Villanueva M. Frecuencia de *Brucella* spp, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157.H7 en quesos frescos sin pasteurizar colectados en la zona conurbada Veracruz-boca del río. (Tesis de maestría). Universidad Veracruzana. 2010.
- Villegas de Gante A, Cervantes EF. La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.* 2011; 19(38):147-164.
- Voulgari K, Hatzikamari M, Delepoglou A, Georgakopolus P, Litopoulou TE, Tzanetakis N. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. *Food Control*. 2010; 21 (2):136-142.
- Ward,L., Brown, J., Davey, G. Two methods for the genetic differentiation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *cremoris* based on differences in the 16S rRNA gene sequence. *FEMS Microbiology Letters* 166. 1998; 15-20.
- Yi L, Dang J, Zhang L, Wu Y, Liu B, Lü X. Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8. *Food control*. 2016; 67: 53-62.
- Yousef AE, Carkstromm C. *Food microbiology: a laboratory manual*. Wiley-Interscience. Hoboken, New Jersey. 2003; 234-237.

**ANEXO 1. Diagramas de flujo de análisis de muestras.**



## ANEXO 2. Estandarización del método de identificación.

Para estandarización del método se utilizó una cepa de colección liofilizada de *L. delbrueckii* ATCC 4797, Lote 06865, con fecha de expiración 6/91, la cual fue diluida con solución salina estéril y llevada al 0.5 en escala Mc Farland, a partir de la cual se inoculó un tubo con 9 mL de solución salina hasta obtener una dilución 1:10. Posteriormente fue probado el rendimiento en 5 condiciones diferentes.

### Elección del medio y condiciones de incubación con mejores rendimientos en recuperación de BAL.


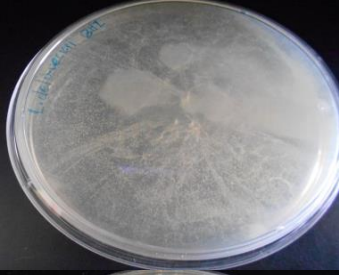



Las condiciones óptimas de recuperación de *L. delbrueckii* fueron evaluadas con las condiciones que aparecen en la tabla 21.

Tabla 21. Condiciones para recuperación de *L. delbrueckii*

Medio	Condiciones.
Caldo Man Rogosa & Sharpe (MRS)	pH 6.6 en jarra de anaerobiosis, incubado 24h a 35±2°C.
Caldo MRS	pH 5.5 en jarra de anaerobiosis incubado 24h a 35±2°C.
Caldo infusión cerebro-corazón (BHI)	Jarra de anaerobiosis 24h a 35±2°C.
Medio OXOID hemocultivo	Baño metabólico 36°C, 30 oscilaciones por minuto.
Caldo MRS 6.6	Baño metabólico 36°C, 30 oscilaciones por minuto.

Se evaluaron las condiciones por duplicado, donde se determinó por conteo cualitativo que el medio con mayor recuperación fue MRS, dado que la dilución más pequeña (1:10) a partir de un cultivo en escala 0.5 McFarland dio incontable en todas las cajas (>250 colonias) (Tabla 22).

Tabla 22. Resultados de crecimiento de *L. delbrueckii* en diferentes condiciones.

Medio cultivo	Numero de UFC/0,1mL	Imagen
MRS pH 5.5	>250 colonias	
BHI	>250 colonias	
MRS 6.6	>250 colonias	
OXOID	>250 colonias	
MRS 6.6	>250 colonias	

Determinación del pH adecuado.

Se prepararon tubos de 15x125 con 9mL de caldo MRS a diferentes pH con un inóculo de 1mL a partir de 0.5 Mc Farland, se leyó absorbancia inicial y final,

determinándose por diferencia de absorbancia la densidad celular aproximada (Tablas 23, 24, 25).

Tabla 23. Absorbancia inicial a diferentes pH cultivo en caldo MRS *L. delbrueckii*.

<b>PH</b>	<b>500</b>	<b>550</b>	<b>600</b>
4.5	0.078	0.044	0.027
5	0.057	0.024	0.010
5.5	0.305	0.147	0.072
6.0	0.189	0.065	0.041
6.5	0.117	0.058	0.029

Tabla 24. Absorbancia final (24hrs) a diferentes pH cultivo en caldo MRS. *L. delbrueckii*.

<b>PH</b>	<b>500</b>	<b>550</b>	<b>600</b>
4.5	0.346	0.277	0.229
5	1.419	1.330	1.252
5.5	1.905	1.721	1.585
6.0	2.086	1.969	1.882
6.5	2.081	1.999	1.931

Tabla 25. Diferencia de absorbancia a diferentes pH. *L. delbrueckii*.

<b>PH</b>	<b>500</b>	<b>550</b>	<b>600</b>
4.5	0.268	0.233	0.202
5	1.362	1.306	1.242
5.5	1.6	1.574	1.513
6.0	1.897	1.904	1.841
6.5	1.964	1.941	1.902

Se determinó que las mejores condiciones de pH fueron leídas a 600nm y pH 6.0 a 6.5 lo que coincide con los parámetros reportados por Elayaraja *et al.* (2014) para *Lactobacillus murinus* y Abo-Amer (2007) para *L. acidophilus*.

Gráfico 2. Absorbancia registrada a diferentes rangos de pH de los cultivos.

Gráfico 3. Lectura de absorbancia a diferentes rangos de longitud de onda.

**Identificación de *Lactobacillus delbrueckii*.**

Para la identificación de la cepa se realizaron pruebas de tinción de Gram, tinción de esporas a través de la técnica de Shaeffer-Fulton y tinción negativa (Tabla 26) para observación de capsula de acuerdo a la metodología expuesta por Rodríguez

*et al* (2005). Además se realizó la identificación bioquímica por triplicado (Tabla 27) de acuerdo a las características establecidas por Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology (2009) y Mac Faddin (2003) se comprobó la existencia de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis*.

Tabla 26. Resultados de pruebas de observación microscópica.

Observación de estructuras bacterias	
Morfología	Bacilos Gram (+) largos.
Presencia de cápsula	Negativa
Presencia de esporas	Negativa

Tabla 27. Resultados de pruebas bioquímicas para identificación de *Lactobacillus delbrueckii*.

Prueba	Resultados								
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidad 25°C/35°C	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Amigdalina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Licuefacción de la gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-

---

(25°C)									
MR/VP	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Nitratos	-	-	-	-	-	-	-	-	-

---

### ANEXO 3. Análisis estadístico de resultados.

Todos los estadísticos se presentan con un porcentaje de confianza del 95% (P=0.05).

#### Análisis estadístico de Tabla 14:

**Two Way Analysis of Variance**

miércoles, marzo 01, 2017, 02:29:48 p.m.

Data source: Data 1 in Notebook2

Balanced Design

Dependent Variable: inhibición

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.099)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.856)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
microorganismo	2	94.178	47.089	3.198	0.053
metodo	2	114.311	57.156	3.882	0.030
microorganismo x metodo	4	209.289	52.322	3.554	0.015
Residual	36	530.000	14.722		
Total	44	947.778	21.540		

Main effects cannot be properly interpreted if significant interaction is determined. This is because the size of a factor's effect depends upon the level of the other factor.

The effect of different levels of microorganismo depends on what level of metodo is present. There is a statistically significant interaction between microorganismo and metodo. (P = 0.015)

Power of performed test with alpha = 0.0500: for microorganismo : 0.409

Power of performed test with alpha = 0.0500: for metodo : 0.521

Power of performed test with alpha = 0.0500: for microorganismo x metodo : 0.660

Least square means for microorganismo :

Group	Mean
L. delbrueckii	9.133
L. lactis	9.267
B. sporogenes	12.267
Std Err of LS Mean = 0.991	

Least square means for metodo :

Group	Mean
DC	10.533
DP	12.000
DD	8.133
Std Err of LS Mean = 0.991	

Least square means for microorganismo x metodo :

Group	Mean
L. delbrueckii x DC	6.400
L. delbrueckii x DP	12.000
L. delbrueckii x DD	9.000
L. lactis x DC	10.000
L. lactis x DP	9.000
L. lactis x DD	8.800
B. sporogenes x DC	15.200
B. sporogenes x DP	15.000
B. sporogenes x DD	6.600
Std Err of LS Mean = 1.716	

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **microorganismo**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
B. sporogene vs. L. delbrueck	3.133	3	3.163	0.079	No
B. sporogenes vs. L. lactis	3.000	3	3.028	0.096	Do Not Test
L. lactis vs. L. delbrueckii	0.133	3	0.135	0.995	Do Not Test

Comparisons for factor: **metodo**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
DP vs. DD	3.867	3	3.903	0.024	Yes
DP vs. DC	1.467	3	1.480	0.553	No
DC vs. DD	2.400	3	2.423	0.214	No

Comparisons for factor: **metodo within L. delbrueckii**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
DP vs. DC	5.600	3	3.264	0.068	No
DP vs. DD	3.000	3	1.748	0.440	Do Not Test
DD vs. DC	2.600	3	1.515	0.538	Do Not Test

Comparisons for factor: **metodo** within **L. lactis**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
DC vs. DD	1.200	3	0.699	0.874	No
DC vs. DP	1.000	3	0.583	0.911	Do Not Test
DP vs. DD	0.200	3	0.117	0.996	Do Not Test

Comparisons for factor: **metodo** within **B. sporogenes**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
DC vs. DD	8.600	3	5.012	0.003	Yes
DC vs. DP	0.200	3	0.117	0.996	No
DP vs. DD	8.400	3	4.895	0.004	Yes

Comparisons for factor: **microorganismo** within **DC**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
B. sporogene vs. L. delbrueck	8.800	3	5.128	0.003	Yes
B. sporogenes vs. L. lactis	5.200	3	3.030	0.095	No
L. lactis vs. L. delbrueckii	3.600	3	2.098	0.311	No

Comparisons for factor: **microorganismo** within **DP**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
B. sporogenes vs. L. lactis	6.000	3	3.497	0.047	Yes
B. sporogene vs. L. delbrueck	3.000	3	1.748	0.440	No
L. delbrueckii vs. L. lactis	3.000	3	1.748	0.440	No

Comparisons for factor: **microorganismo** within **DD**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.05
L. delbrueck vs. B. sporogene	2.400	3	1.399	0.589	No
L. delbrueckii vs. L. lactis	0.200	3	0.117	0.996	Do Not Test
L. lactis vs. B. sporogenes	2.200	3	1.282	0.640	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

## Análisis estadístico Tabla 16

### Two Way Analysis of Variance

miércoles, marzo 01, 2017, 03:20:37 p.m.

Data source: Data 1 in Notebook2

General Linear Model (No Interactions)

Dependent Variable: inhibicion

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.240)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.105)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
patogeno indicador	2	58.338	29.169	1.215	0.311
cepa de lactococcus productor	4	370.532	92.633	3.859	0.012
Residual	29	696.051	24.002		
Total	35	1130.306	32.294		

The difference in the mean values among the different levels of patogeno indicador is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in cepa de lactococcus productor . There is not a statistically significant difference (P = 0.311).

The difference in the mean values among the different levels of cepa de lactococcus productor is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in patogeno indicador. There is a statistically significant difference (P = 0.012). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **cepa de lactococcus productor**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
L 1 vs. ATCC 4797	7.778	5	4.763	0.017	Yes
L 1 vs. L 3	1.963	5	0.787	0.980	No
<hr/>					
L 1 vs. L3	1.019	5	0.540	0.995	Do Not Test
L 1 vs. L2	0.111	5	0.0680	1.000	Do Not Test
L2 vs. ATCC 4797	7.667	5	4.695	0.019	Yes
L2 vs. L 3	1.852	5	0.742	0.984	Do Not Test
L2 vs. L3	0.907	5	0.481	0.997	Do Not Test
L3 vs. ATCC 4797	6.759	5	3.585	0.111	No
L3 vs. L 3	0.944	5	0.354	0.999	Do Not Test
L 3 vs. ATCC 4797	5.815	5	2.331	0.480	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.