UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS DEL GÉNERO *LACTOBACILLUS* PARA LA PRODUCCIÓN DE QUESOS ARTESANALES.

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS.

PRESENTA

CÉSAR ALEJANDRO MARTÍNEZ ALDAY

DIRECTOR DE TESIS

DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA **AGOSTO 2018**

COMITÉ ASESOR

Evaluación del potencial probiótico de bacterias del Género *Lactobacillus* para la producción de quesos artesanales. Tesis presentada por César Alejandro Martínez Alday, como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado

Dr. Gilberto López Valencia

DIRECTOR

MC. Laura Elena Silva Paz

ASESOR

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto

ASESOR

Dr. José Carlomán Herrera Ramírez

ASESOR

Dr. Francisco Javier Monge Navarro

ASESOR

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

De igual manera, agradezco el apoyo a mi director de tesis el Dr. Gilberto López Valencia y a mi co-asesora M.C. Laura Elena Silva Paz, por su guía durante el proceso de elaboración de este proyecto, por sus comentarios, observaciones y asesorías para poder llegar al término del mismo.

DEDICATORIA

A mis padres Raúl Martínez y Mónica Alday por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A mi abuela Leticia Cano Méndez y a mi tía Ma. Leticia Alday por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mis amigos y compañeros y todas las personas que conocí y estuvieron conmigo apoyándome durante mi paso en cada una de las etapas del transcurso de la maestría.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

RESUMEN

En la comunidad de Ojos Negros, Real del Castillo desde hace más de 100 años se elabora queso artesanal, el cual no tenía antecedentes de estudios que caractericen a las Bacterias ácido lácticas presentes en ellos, desconociendo el potencial benéfico que puedan tener. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la capacidad antimicrobiana de 3 especies de *Lactobacillus* aisladas a partir de queso artesanal, evaluando su capacidad probiótica, llevando a cabo estudios de sensibilidad de microorganismos patógenos, la medición de su capacidad acidificante y susceptibilidad a antimicrobianos. Logrando identificar la presencia de actividad inhibitoria contra microorganismos patógenos del género *Salmonella tiphymurium, Staphilococcus aureus* y *Escherichia coli.* Identificando además, características fisicoquímicas favorables para llevar a cabo el descenso de pH óptimo, producción de ácido láctico y su sensibilidad a antibióticos haciéndolas candidatas para su aplicación como probióticos, determinando a las cepas identificadas como cultivos iniciadores otorgándole al producto cierta seguridad al impedir el desarrollo de microorganismos de riesgo para la salud.

ABSTRACT

In the community of Ojos Negros, Real del Castillo for more than 100 years, artisanal cheese has been made, which has no history of studies that characterize the lactic acid bacteria present in them, ignoring the beneficial potential they may have. The objective of the present work was to study the probiotic capacity of 3 *Lactobacillus* species isolated from artisanal cheese, evaluating their antimicrobial capacity, carrying out sensitivity studies of pathogenic microorganisms, measuring their acidifying capacity and susceptibility to antimicrobials. We managed to identify the presence of inhibitory activity against pathogenic microorganisms of the genus *Salmonella tiphymurium*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Identifying, in addition, favorable physicochemical characteristics to carry out the decrease of optimum pH, production of lactic acid and its sensitivity to antibiotics making them candidates for their application as probiotics, determining the strains identified as starter cultures giving the product some security by preventing the development of microorganisms of risk for the health.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN 1

II. REVISIÓN DE LITERATURA 4

2.1 Bacterias ácido lácticas (BAL), definición y características 4

2.2 Bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* 7

2. 2. 1 *Lactobacillus plantarum* 8

2. 2. 2 *Lactobacillus paracasei* 9

2. 2. 3 *Lactobacillus zeae* 10

2. 3 Componentes antimicrobianos producidos por BAL. 10

2. 3. 1 Ácidos orgánicos 11

2. 3. 2 Compuestos no proteicos 12

2. 3. 3 Metabolitos del oxígeno. 13

2. 3. 4 Bacteriocinas 14

2. 3. 4. 1 Bacteriocinas producidas por Lactobacillus 22

2. 4 Métodos de detección de actividad antimicrobiana 22

2. 4. 1 Prueba de la gota 23

2. 4. 2 Ensayo de difusión en disco 24

2.4.3 Ensayo de difusión en pozo 25

2. 5 Prueba de resistencia a antibióticos 27

2.6 Microorganismos patógenos de importancia en alimentos 28

2. 6. 1 *Salmonella* 29

2. 6. 2 *Staphilococcus aureus* 30

2. 6. 3 *Escherichia coli* 31

III. MATERIALES Y METODOS 32

3. 1 Lugar de estudio 32

3. 2 Fuente de las bacterias del género *Lactobacillus* 32

3. 3 Fuente de las bacterias patógenas 34

3. 4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *Lactobacillus* por ensayo de difusión en disco 34

3.5 Evaluación de la actividad acidificante de las especies de *Lactobacillus* 36

3. 6 Prueba de sensibilidad a antibióticos en *Lactobacillus* 37

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 39

4.1 Actividad inhibitoria de las cepas de *Lactobacillus* 39

4. 2 Actividad acidificante de cepas de *Lactobacillus* a diferentes horas de cultivo. 41

4. 3 Sensibilidad a antibióticos 44

V. CONCLUSIONES 48

VI. LITERATURA CITADA 50

VII. ANEXOS 68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fermentación láctica homofermentativa (Adaptada de Larpent, 1995) 5

Figura 2. Fermentación láctica heterofermentativa (Adaptada de Larpent, 1995) 5

Figura 3. Modo de acción de los lantibioticos (Clase I), no-lantibioticos (Clase II) y bacteriolisinas (Clase III) (Adaptado de Cotter et al., 2005) 19

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Bacteriocinas producidas por Lactobacillus aislados de productos lácteos. 22

Cuadro 2. Identificación fenotípica y genotípica de especies de Lactobacillus (Lb) aisladas de queso artesanal de Ojos Negros. 33

Cuadro 3. Antibióticos utilizados en la prueba de sensibilidad a antibióticos.... 37

Cuadro 4. Actividad inhibitoria que presentan 14 cepas de Lactobacillus contra patógenos probados por método de difusión en disco..... 39

Cuadro 5. Producción de acidez y ácido láctico en 14 cepas de Lactobacillus (Lb) a diferentes horas de cultivo..... 43

Cuadro 6. Cepas de Lactobacillus resistentes antibióticos que actúan sobre la pared celular 45

Cuadro 7. Cepas de Lactobacillus resistentes a antibióticos que actúan sobre síntesis de proteína y ácidos nucleicos..... 46

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL), se definen como una clase de microorganismos gram positivos, no patógenos, fermentadores de carbohidratos, lo que las hace útiles como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos como la leche cruda o pasteurizada en la que además, pueden encontrarse microorganismos indeseables para la salud y los alimentos (Crittenden, 2009; Franciosi et al., 2009). Los géneros *Lactobacillus, Lactococcus* y *Leuconostoc,* pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) que se encuentran principalmente en productos lácteos como quesos y se consideran benéficas ya que poseen un potencial antimicrobiano y de conservación debido a la producción de metabolitos como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo, péptidos antimicóticos y antimicrobianos como las bacteriocinas previniendo así el crecimiento de microorganismos patógenos y deterioradores además que intervienen en el proceso de maduración del queso (Stoyanova et al., 2012; Ghanbari et al., 2013; Favaro et al, 2014); siendo estas en conjunto, una alternativa natural para preservar y alargar el tiempo de vida en anaquel de los alimentos reduciendo el uso de conservadores y tratamientos químicos generando productos con mejores propiedades nutricionales y organolépticas (Gálvez et al., 2007; Millete et al., 2008).

En la búsqueda de diversificar las contribuciones de la salud pública en materia de nutrición y alimentación, se deben identificar nuevas fuentes de alimentos que contengan características benéficas que contribuyan al

mejoramiento de la calidad de vida. En la comunidad de Ojos Negros, Real del Castillo desde hace más de 100 años se elabora queso artesanal que goza de gran aceptación por el consumidor sin embargo hasta el momento no se han caracterizado las BAL presentes en los quesos que ahí se producen y que puedan poseer el potencial de actividad antimicrobiana y susceptibilidad hacia varios antibióticos.

Objetivo

Identificar la actividad antimicrobiana y valorar el potencial probiotico de las especies de BAL del género *Lactobacillus* aislados de queso artesanal del área de Ojos Negros y medir la capacidad de inhibición de las bacterias patógenas *Salmonella spp, Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* .

Objetivos específicos

1.- Evaluar la actividad inhibitoria de los sobrenadantes de *Lactobacillus* contra tres bacterias patógenas: *Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Staphilococcus aureus* 9091 y *Escherichia coli* 1822B.

2.- Evaluar la capacidad acidificante de cepas de *Lactobacillus* a diferentes periodos de cultivo.

3.- Evaluar la resistencia de las cepas de *Lactobacillus* asiladas contra antibióticos que actúan sobre la pared celular, sobre la síntesis de proteína y sobre la síntesis de ácidos nucleicos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Bacterias ácido lácticas (BAL), definición y características

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son cocos o bacilos gram positivos, no forman esporas, no presentan movilidad, son negativas a la producción de catalasa y bencidina; tampoco reducen el nitrato a nitrito. Carecen de actividad respiratoria por la ausencia de la enzima citocromo catalasa, por tanto son anaerobias, microaerofílicos o aerotolerantes y pueden formar colonias en medios de cultivo solido en presencia de aire, esto es posible debido a contiene un grupo hemina, que les permite poner en marcha la cadena respiratoria con el oxígeno como aceptor de electrones (Crittenden R, 2009; Vásquez et al., 2009; Siamansouri et al., 2013). Además, tienen un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como el mayor producto final de la fermentación de los azucares vía Embden-Meyer-glucolisis (homofermentación, fig. 1), la tolerancia de las bacterias ácido lácticas a este ácido orgánico, ha hecho que este grupo de microorganismos se emplee en la industria alimentaria para la conservación de los alimentos debido a su capacidad para inhibir o reducir la contaminación por microorganismos deterioradores y/o patógenos mediante la producción de este compuesto, además de otros como etanol, acetato y CO_2 por la vías del ácido-6-fosfoglucónico (heterofermentación, fig. 2) mejorando así las propiedades organolépticas de productos lácteos, cárnicos y vegetales (Martínez et al., 2013; Siamansouri et al., 2013; O'Brian et al., 2015). La utilización de una u otra vía depende de la presencia de las enzimas que

intervienen en la transformación del azúcar en ácido, la frucosa-1,6-bifosfato-aldolasa en el caso de la homofermentación y una fosfocetolasa en la heterofermentación (Cabeza, 2006).

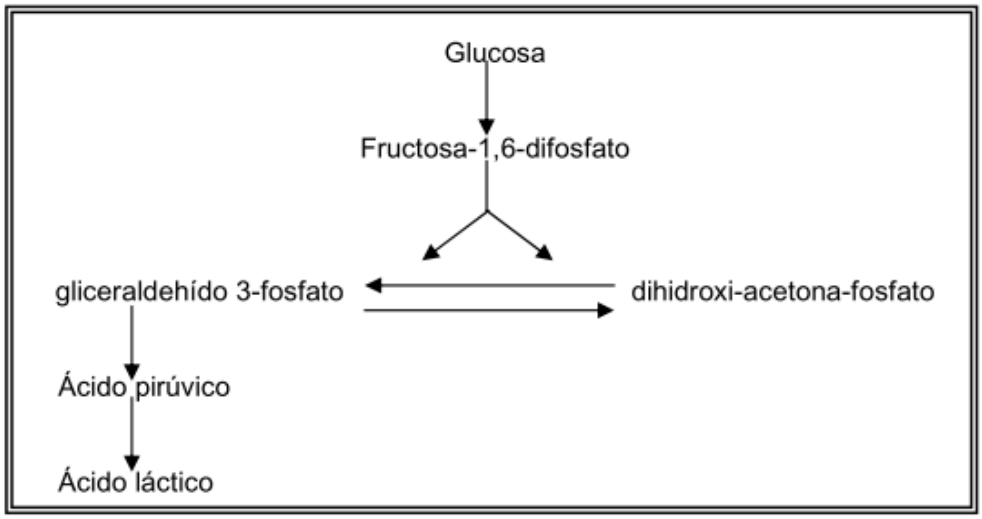

Figura 1. Fermentación láctica homofermentativa (Adaptada de Larpent, 1995)

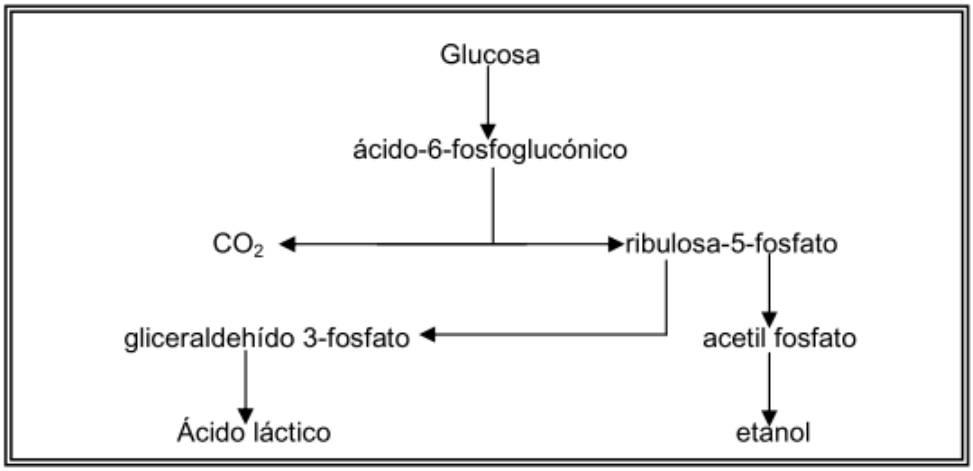

Figura 2. Fermentación láctica heterofermentativa (Adaptada de Larpent, 1995)

Otras características de este grupo de bacterias es su tolerancia al pH ácido (pH= 4 a 4.5) y la síntesis de dextranos (Todorov y Franco, 2010; Ramírez-Rosas et al., 2011).

Las BAL pueden encontrarse en diversos nichos ecológicos, siempre que en ellos haya abundantes fuentes de carbohidratos hidrosolubles, productos de degradación de proteínas, vitaminas y una tensión de oxígeno reducida. Las podemos encontrar en hábitats tan variados como la leche y derivados, vegetales, carne y derivados, bebidas fermentadas, formando parte de la microbiota gastrointestinal y genitourinaria del hombre y animales; por ello se consideran como organismos seguros o GRAS, del inglés *General Regarded As Safe* (Azadnia et al., 2011; Obed, 2011). Estas bacterias tienen necesidades complejas de factores de crecimiento como: vitamina b, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas, siendo estas algunas de las razones del porque abundan en un medio nutricionalmente tan rico como la leche (Serna-Cock y Rodríguez, 2005; Cabeza, 2006).

La clasificación de las BAL en géneros diferentes se basa en un principio en la morfología, modo fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), el crecimiento a diferentes temperaturas (mesófilos, 25-30°C y termófilos 40-44°C) (Villega et al*.,* 2006; Zambrano, 2010), la configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal (6.5%) y tolerancia ácida o alcalina (pH 4.5-7), dentro de las BAL, los géneros más utilizados para la obtención de alimentos y bebidas fermentadas son *Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Oenococcus* y

dentro del género *Streptococcus* la especie *S.thermophilus* (Ferreira, 2012; Sanchez y Tromps, 2014).

De acuerdo a sus características fermentativas las BAL se pueden clasificar en: homofermentativas, quienes degradan las hexosas exclusivamente a ácido láctico y no fermentan las pentosas o el gluconato; y las heterofermentativas las cuales degradan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y CO_2 y las pentosas a ácido láctico y ácido acético. Las facultativas heterofermentativas fermentan las hexosas a ácido láctico, pueden producir CO_2 a partir del gluconato pero no de la glucosa. Ellos también fermentan las pentosas para producir ácido láctico y acético (Helmut et al., 2011; Gänzle, 2015).

2.2 Bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*

Es el género más grande con 183 especies, forman bacilos Gram positivos con la capacidad de fermentar glucosa y producir ácido láctico. Este género de bacterias es el dominante del sistema gastrointestinal y urinario de humanos y animales y juega un papel importante en el mantenimiento y recuperación de la salud (Ghanbari et al., 2013; Mahrous et al., 2013). Muchas especies de este género son reconocidas como seguras para su consumo y debido a esto son utilizadas en la producción de alimentos (de Almeida Júnior et al*.,* 2015). Algunas especies del género *Lactobacillus,* incluyendo *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus paracasei y Lactobacillus zeae* han sido utilizadas como probióticos (de Vos, 2011). Además son utilizadas como componentes

iniciadores en la fermentación especialmente de productos lácteos tales como leche cruda, quesos, yogurts y leches fermentadas, están presentes naturalmente o adicionados intencionalmente por razones tecnológicas o para generar efectos benéficos a la salud de los consumidores (Coeuret et al*.,* 2003).

2. 2. 1 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum es una bacteria de la familia *Lactobacillaceae,* capaz de realizar la fermentación láctica. Es comúnmente localizada en diversos productos fermentados como productos lácteos común y frecuentemente en una gran variedad de quesos de todo el mundo (Belicová et al., 2013), carne, frutas y vegetales (da Silva et al., 2014). Es una bacteria heterofermentativa, con habilidad de crecer entre 15° y 45° más no a 48°C. Puede crecer hasta con un 4% de sales biliares y generalmente a una concentración de 4% de NaCl, con capacidad para crecer en pH ácido a neutro (2.5-7) tienen la habilidad de sobrevivir en el tránsito intestinal y de colonizar el tracto gastro-intestinal de humanos y otros mamíferos (De Vries et al., 2006; Gámez et al., 2015).

Esta bacteria es empleada como un cultivo iniciador en varios alimentos fermentados contribuyendo a sus propiedades organolépticas, sabor y textura (Todorov y Franco, 2010). Algunas cepas son conocidas por producir sustancias antimicrobianas conocidas como bacterinas (Plantaricinas) que son activas contra ciertos patógenos Gram-positivos. Numerosos estudios han reportado la producción de estas Plantaricinas por cepas de este género

(Todorov, 2009), al evaluar su aplicación para el control del crecimiento de patógenos transmitidos por alimentos como *Stahpylococcus aureus, Salmonella tiphymurium, Escherichia coli y Listeria monocytogenes (*Rodríguez, 2009; Zapata et al, 2009; Atassy y Servin, 2010).

2. 2. 2 *Lactobacillus paracasei*

La especie de *Lactobacillus paracasei* es una bacteria Gram-positiva, perteneciente a la división *Firmicutes*, y clase *Bacilli,* orden *Lactobacillales* y familia *Lactobacillaceae*, no adherentes, catalasa negativas, carecen de citocromos y tienen hábitos no aeróbicos, pero son aerotolerantes (Axelsson, 1998), es heterofermentativa facultativa comúnmente usada en la fermentación de productos lácteos y como probiótico (Stolaki et al., 2011; Zhou y Yuquin, 2015). *L. paracasei* es una bacteria que opera por comensalismo. Es comúnmente encontrarla en el tracto gastrointestinal y oral de humanos, así como productos lácteos como quesos madurados, ensilajes y aguas residuales (Smokvina, 2013). Es una bacteria en forma de bacilo con una anchura de 2,0 a 4,0 µm y una longitud de 0,8 a 1,0 µm. Crece a una temperatura optima de 10 a 37 °C, con capacidad de crecer a temperaturas hasta 40 °C pero no a 45° (Radulovic et al., 2010; Zhou y Yuquin, 2015). *L. paracasei* es muy resistente a condiciones de bajo pH (2.5) y muestra resistencia a la bilis a las concentraciones presente en el duodeno (Danisco, 2008; Radulovic et al., 2010).

2. 2. 3 *Lactobacillus zeae*

Lactobacillus zeae es una bacteria Gram positiva en forma de varilla (aproximadamente 0,5 a 0,6 por 1,2 a 2,4 μm) y se producen individualmente o en cadenas, facultativamente heterofermentativa, inmóvil, no produce esporas (Zhou y Yuquin, 2015). Los ensayos de catalasa, benzidina, ureasa e indol son negativos. Crece a una temperatura de 10 y 45°C y a un pH con un rango de 2.5 hasta 6. Las colonias de superficie en agar MRS son lisas, brillantes, blancas y de 1 a 2 mm de diámetro. Produce principalmente ácido L - (+) - láctico y una cantidad menor de ácido D - (-) - láctico. El ácido se produce a partir de amígdala, celobiosa, fructosa, galactosa, gluconato, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, melezitosa, ribosa, salicina, sacarosa, tagatosa, trehalosa y turanosa. El ácido no se produce a partir de arabinosa, dextrina, inositol, inulina, lactato, melibiose, rafinosa, sorbitol (sólo cepa ATCC 393T), sorbosa, almidón y xilosa. La cepa ATCC 15820T fermenta la ramnosa, mientras que la cepa ATCC 393T no. El gas se produce a partir de gluconato. El nitrato no se reduce a nitrito, y el amoníaco no se produce a partir de arginina; hidroliza la esculina (Dicks et al., 1996; García y Jerez, 2004; León, 2012; Zhou y Yuquin, 2015).

2. 3 Componentes antimicrobianos producidos por BAL.

Las BAL, además de su función tecnológica, han demostrado tener actividad antagonista contra microorganismos patógenos y asociados al deterioro. La actividad antimicrobiana de las BAL se debe a la competencia por

lo nutrientes o por la generación de metabolitos que establecen factores tales como aumento de la acidez del medio y su pH, biogeneración rápida de ácidos orgánicos, bacteriocinas, péptidos antimicrobianos, peróxido de hidrógeno, kefirano, etanol y diacetilo, además de bajo potencial redox y disminución del contenido de nutrientes (Reis et al., 2012; Macuamule et al., 2016; Miao et al., 2016).

La utilización de los carbohidratos disponibles en los alimentos y la reducción del pH a causa de los ácidos orgánicos producidos, son el principal mecanismo de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas (Cástulo et al., 2008; Suarez et al., 2008).

2. 3. 1 Ácidos orgánicos

La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos y del pH es complementaria, siendo la fracción no disociada de los ácidos orgánicos la que posee una mayor actividad inhibidora debido a la naturaleza de disolver lípidos, ya que pueden atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma. Estas moléculas pueden ejercer dos efectos: a) interferir con funciones celulares, como puede ser la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa; b) la disociación de los ácidos orgánicos provoca el incremento de protones en el interior celular. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se

provoca el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de la célula, interfiriendo así con la viabilidad (Urrego y Cadavid, 2005; Vásquez et al., 2009).

2. 3. 2 Compuestos no proteicos

Entre los compuestos no proteicos que producen las BAL durante su crecimiento se encuentran la reuterina como potencial probióticos en los alimentos. Esta sustancia a diferencia de las bacteriocinas y el peróxido, solo se produce por *Lactobacillus reutery*, aislado del tracto gastrointestinal de personas y animales; su potencial tóxico aún no se ha evaluado, aunque por su naturaleza existen dudas acerca de su posible utilidad en la industria alimentaria. Su actividad antimicrobiana es extraordinariamente amplia, afectando bacterias gram positivas, gram negativas, levaduras, mohos y protozoos. La reuterina se forma durante la utilización anaerobia del glicerol e inhibe la actividad de la enzima ribonucleotidoreductasa involucrada en la síntesis del DNA, lo que determina su amplio espectro antimicrobiano; su efectividad se lleva a cabo en un intervalo de pH de 2 a 8, siendo más estable a pH ácido (2), mientras que a pH 11 se degrada inmediata e irreversiblemente (Rodríguez et al., 2003; Vollenweider et al., 2010).

La reuterina es activa frente a numerosos microorganismos patógenos y alterantes asociados a alimentos. Por sus características, se ha propuesto

como bio-conservante en la mejora de la calidad y seguridad de alimentos (Axelsson et al., 1989; Vollenweider et al., 2003).

2. 3. 3 Metabolitos del oxígeno.

El crecimiento de BAL en medios anaerobios conduce a la formación de varios metabolitos del oxígeno como: peróxido de hidrógeno, aniones súper óxido y radicales libres, que poseen un efecto bacteriostático y bactericida frente a la flora láctica y no láctica (Ammor et al., 2006). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) funciona como un oxidante produciendo radicales libres que atacan los componentes esenciales de la membrana como lípidos, proteínas y DNA, generando así la susceptibilidad de la célula de muchos microorganismos; la acumulación del (H_2O_2) en los medios de cultivo, se debe a que las BAL, en general no poseen catalasa. El peróxido de hidrógeno ha sido estudiado más ampliamente en leche cruda, donde se genera el sistema antimicrobiano “lactoperoxidasa”, sin embargo a pesar de su potencial en la preservación, es reconocida la poca viabilidad de este compuesto en los alimentos, ya que puede tener efectos perjudiciales en su calidad organoléptica causando rancidez de las grasas y reacciones de decoloración (Schnürer y Magnusson 2005, Jang et al., 2008).

El dióxido de carbono es un producto final de la heterofermentación y en ocasiones se obtiene por descarboxilación de aminoácidos por BAL. El dióxido de carbono promueve un ambiente anaeróbico, reduce el pH y puede ayudar a destruir la integridad de la pared celular microbiana (Ouwehand, 1998).

Así mismo, el diacetilo es producido por BAL a través del metabolismo bacteriano de la glucosa vía piruvato (fermentación homofermentativa) encargándose de impartir propiedades aromáticas de sabor y olor a mantequilla. Se ha mostrado la actividad antimicrobiana del diacetilo a nivel de 200 µg/ml para levaduras y a 300 µg/ml para bacterias Gram positivas no lácticas (Axelsson, 1998; Ouwehand, 1998).

2. 3. 4 Bacteriocinas

Las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL) son de particular interés para la industria alimentaria: son péptidos o proteínas pequeñas (<10 kDa), sintetizadas por los ribosomas y que poseen actividad antimicrobiana con diferentes niveles y espectros de actividad, mecanismos de acción, peso molecular y propiedades fisicoquímicas, que pueden ser sintetizadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas (Beshkova y Frengova, 2012; Stoyanova et al, 2012; Mondragon-Preciado et al., 2013) Tienen dos mecanismos de acción principales, el primero de acción bactericida que produce la muerte del microorganismo patógeno y actividad bacteriostática, que inhibe el crecimiento bacteriano (Paredes y Roca, 2004) sobre moléculas superficiales de la membrana de la célula blanco en donde se lleva a cabo el acoplamiento de la bacteriocina producida por otra bacteria; además, la composición química de éstas sustancias es muy variada y su modo de acción específico (Vásquez et al, 2009). Razón por la cual sirven como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos (Fernández, 2005). Las bacteriocinas que producen las BAL han sido

intensamente estudiadas por su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Clostridium botulinum* y *Salmonella*, entre otras (Motta et al., 2008; Vásquez et al., 2009; Andrade et al., 2015).

Existen numerosas bacteriocinas y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada para la manipulación de poblaciones bacterianas a nivel de tracto digestivo con el fin de excluir patógenos, mejorar la digestibilidad e incrementar la actividad inmunológica de muchas especies animales y son ampliamente utilizadas en la cría de cerdos, aves y recientemente ha surgido un interés sobre su aprovechamiento como conservadores biológicos puros en la industria alimentaria que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores sintéticos (Monroy et al., 2009; Beristain-Bausa et al.; 2012).

Las bacteriocinas contienen puentes disulfuro, tipo éter o grupos tiol libres y cuentan con puntos isoeléctricos en un intervalo de pH 8.6 a 10.4 (Cotter et al., 2005).

La producción de las bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma y generalmente está influenciado por el mecanismo de detección de quórum o por cualquier signo de estrés (Martínez et al., 2013). Entre sus principales características destacan ser termo resistentes lo que les permite mantener su actividad antimicrobiana tras someterlas a temperaturas similares a las de la pasteurización y esterilización de la leche (63° a 110° C) y a pH ácidos (1.3 -

3.5) (Alquicira, 2006; Benmechernene et al., 2013). Sin embargo, aunque las bacteriocinas presentan estabilidad a pH ácido (1.3) o neutro (5.5) son fácilmente destruidas a pH mayor de 10 (Jack et al., 1995). Dicha estabilidad puede deberse a la formación de estructuras globulares pequeñas y a la presencia de regiones hidrofóbicas, así como a la formación de enlaces cruzados estables (Alquicira, 2006).

Debido a su naturaleza proteica, las bacteriocinas son inactivadas por proteasas, incluyendo las de origen pancreático y gástrico, debido a ello durante su paso por el tracto gastrointestinal son inactivadas, sin ser absorbidas como compuestos activos resultando así presuntivamente inocuas para el consumidor (Quintero, 2006).

Las bacteriocinas han sido agrupadas en cinco clases de acuerdo a distintos criterios de clasificación tales como el peso molecular, propiedades físicas, estructuras químicas, modo de acción y características genéticas y bioquímicas (Monroy et al., 2009; Abriouel *et al.,* 2011; Zacharof y Lovitt, 2012; Balciunas et al., 2013):

- Clase I o lantibióticos, de bajo peso molecular menor a 5 kDa, resistentes a altas temperaturas y con aminoácidos no comunes como lantionina, metillantionina, dehidrohilamina y dehidrobutirina.
- clase II, denominados no lantibióticos, estables al calor y al pH con un peso molecular menor a 10 kDa, no contienen aminoácidos modificados, este grupo de bacteriocinas es considerado como el

mayor subgrupo de bacteriocinas provenientes de las BAL, no solo por su gran número, sino también por su actividad antimicrobiana y aplicaciones potenciales.

- clase III, son termolábiles, este grupo es denominado “bacteriolisinas”, incluye péptidos con un peso molecular mayor a 30 kDa y son sensibles a la inactivación a altas temperaturas.
- Clase IV son péptidos grandes y de estructura compleja, ya que se encuentran asociados a carbohidratos (glicoproteínas) o lípidos (lipoproteínas).
- Clase V, se encuentran los péptidos con una estructura circular que no posee modificación postraduccionales, siendo la enterocina AS-48 un ejemplo de esta clase (Zacharof y Lovitt, 2012.

De acuerdo con Cintas *et al.* (2001) se ha determinado que las bacteriocinas demuestran alta actividad bactericida que se relaciona con el contenido de cistina y, de acuerdo con ello se establecen tres grupos:

a) Bacteriocinas con espectro inhibitorio estrecho, cuyos productos inhiben microorganismos de la misma especie.
b) Bacteriocinas con espectro inhibitorio intermedio, cuyos productos inhiben otros géneros de BAL, bacterias Gram positivas y patógenos presentes en alimentos.
c) Bacteriocinas con amplio espectro de inhibición que actúan contra un gran número de bacterias Gram positivas.

La acción de las bacteriocinas está determinada por la composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de una proteína en función de la inmunidad, además de la composición química del medio ambiente (Cintas et al., 2001; Heerklotz et al., 2004).

Las bacteriocinas actúan en células sensibles, desestabilizan y permeabilizan la membrana citoplasmática por medio de la formación de poros en la membrana celular, causando la disipación o reducción de la fuerza motriz de la célula debido a la interacción con polímeros aniónicos que constituyen la pared celular, lo cual se inicia con la atracción de las bacteriocinas hacia la bacteria diana a través de fuerzas electrostáticas, debido a que las bacteriocinas están cargadas positivamente e interactúan con los fosfolípidos de la membrana de las bacterias que se encuentran cargadas negativamente. Además, la naturaleza anfipática de las bacteriocinas facilita aún más su distribución a lo largo de la superficie de la membrana celular de la bacteria, dando salida a compuestos como fosfato, potasio, aminoácidos, ATP, disminuyendo la síntesis de macromoléculas y por consecuencia la muerte celular (Nishie et al., 2012: Yusuf, 2013; Bemena et al., 2014). Cotter et al. (2005) determinaron que las bacteriocinas de bacterias Gram positivas presentan diferentes modos de acción de acuerdo a su clasificación (Fig3).

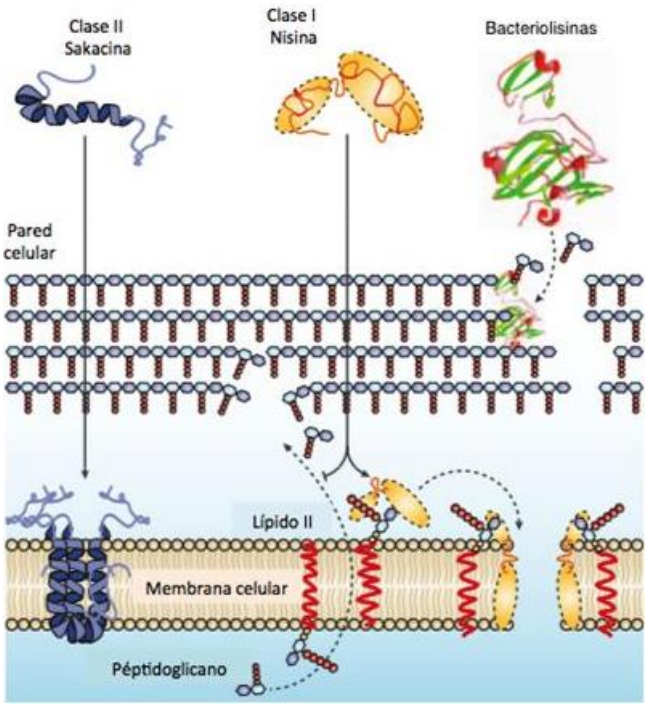

Figura 3. Modo de acción de los lantibioticos (Clase I), no-lantibioticos (Clase II) y bacteriolisinas (Clase III) (Adaptado de Cotter et al., 2005)

Las bacteriocinas de la clase 1, como la nisina, han demostrado tener un modo de acción dual, la bacteriocina se una a la pared celular mediante atracciones electrostáticas (etapa 1). Después, la nisina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano (principal compuesto de la pared celular, y utiliza esta molécula para anclarse a la membrana celular (etapa 2). Luego, la bacteriocina cambia su orientación en relación con la membrana y se inserta en ésta, finalmente, la unión de diversos péptidos en el sitio de inserción provoca la formación de un poro que permite la salida de moléculas importantes como aminoácidos y ATP, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte celular (etapa 3) (López et al., 2008; Pérez et al., 2014).

Los no-lantibióticos (clase II) contienen dos péptidos en su estructura principal, los cuales pueden presentar actividades duales distribuidas a través de sus dos péptidos. Los péptidos de esta clase tienen una estructura anfifílica helicoidal, lo que les permite orientarse e insertarse en la membrana de la célula, provocando la muerte celular. El modo de acción principal se debe a las interacciones con la membrana celular, se inicia con el reconocimiento entre la bacteriocina y el receptor de la membrana celular, seguido de una serie de interacciones electrostáticas, que le permite insertarse dentro de la membrana interfiriendo con su estructura y conduciendo a una despolarización y muerte (Hu et al., 2006).

El mecanismo de la pediocina PA-1 es el más estudiado. En este caso, el extremo N-terminal de la molécula adopta una conformación β que es estabilizada por un puente disulfuro entre Cisteína-9 y Cisteína-14, para promover la unión de los aminoácidos catiónicos (Lisina-11 e Histidina-12) a los fosfolípidos aniónicos, en la membrana a través de interacciones electrostáticas. Posteriormente el extremo C-terminal sufre transformación donde el puente disulfuro entre Cistéina-24 y Cisteína 44 ayuda a la formación de una estructura α-helicoidal que favorece el contacto con los lípidos de la membrana celular. La pediocina PA-1 se introduce en la membrana, causando la formación de poros y la disipación de protones lo que causa un colapso en el gradiente de la membrana, incrementando el voltaje celular y haciendo susceptible a la célula de perder iones intracelulares y ATP, absorbiendo

radiación UV y evitando el transporte de aminoácidos; para finalmente provocar la muerte celular (Naidu et al., 2006).

El mecanismo de acción de las bacteriocinas de la clase III “bacteriolisinas” es menos complejo con respecto a los lantibioticos y no-lantibioticos, ya que actúan directamente sobre la pared celular de las bacterias Gram positivas lo que conduce a la muerte y lisis de la célula (Cotter et al., 2005).

La composición y estructura del alimento tiene un significativo efecto dinámico y factores de interacción importantes, como la temperatura de almacenamiento y los ingredientes presentes pueden favorecer o inhibir la acción de la bacteriocina como la glucosa o ácidos, la. Un pH puede favorecer la producción de bacteriocinas e incrementar su actividad (Elegado et al., 2005; Grande et al., 2006).

La actividad antibacteriana se pronuncia en la fase logarítmica temprana y en la fase estacionaria (Ogunbanwo et al., 2003) por lo que a la hora de aplicar las bacteriocinas a un alimento a partir de un cultivo iniciador o para su purificación, es importante considerar que, según Pal et al. (2005), las etapas de velocidad máxima de producción de la bacteriocina es la fase logaritmica, con el fin de aumentar la efectividad del proceso de acción de estos compuestos ante microorganismos de deterioro o patógenos importantes.

Las bacteriocinas ejercen su poder antimicrobiano ante microorganismos relacionados o presentes en su ambiente (Grande et al., 2006), esto hace que

los microorganismos de deterioro o patógenos puedan presentar distintos comportamientos ante la presencia de la bacteriocina.

2. 3. 4. 1 Bacteriocinas producidas por Lactobacillus

Numerosas cepas de bacteriocinas producidas por el género *Lactobacillus* han sido aisladas en las últimas dos décadas y así mismo han sido evaluadas. En el cuadro 1 se identifican a bacteriocinas aisladas en productos lácteos.

Cuadro 1. Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus* aislados de productos lácteos.

Cepa	Bacteriocina	Patógeno que inhibe	Referencia
L. delbruekii		*E. coli, L. monocytogenes, S. aureus, E. faecalis*	Miteva et al., 1998
L. paracasei sbsp *paracasei*	Bacteriocina 217	*E. coli, Salmonella* spp., *P. aeruginosa, B. cereus., S. aureus, S. faecalis, Micrococcus flavus*	Lozo et al., 2004
L. plantarum AMA-K	Bacteriocina AMA-K	*Enterococcusspp., E. coli, Klebsiella pneumoniae*y *Listeria* spp.	Todorov et al, 2007
L. plantarum ST8KF	BacST8KF	*Listeria innocua, Lactobacillus casei, Lactobacillus salivarus* y *Lactobacillus curvatus*	Powell et al., 2007
L. plantarum LB-B1	Pediocin LB-B1	*Listeria* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., y *E. coli*	Xie et al., 2011

2. 4 Métodos de detección de actividad antimicrobiana

Las BAL aisladas de diferentes fuentes como material vegetal, productos alimenticios, humanos y animales pueden ser examinadas a partir de la

actividad antimicrobiana, y es importante poder analizar una gran cantidad de cepas de manera fácil, rápida y confiable, un parámetro a considerar cuando se realizan ensayos para la detección de la actividad antimicrobiana es el medio de cultivo particular que se usa para cultivar la cepa sensible (O'Bryan et al., 2015). Experimentos recientes indican que, cuando se cultiva una cepa sensible en un medio que contiene hidrolizado enzimático de caseína, se forman zonas de inhibición más pequeñas que cuando se cultivan en un medio con caseína hidrolizada ácida, la presencia de más péptidos de tamaño mediano en el hidrolizado enzimático puede interferir de algún modo con la actividad de la bacteriocina, tal vez por la formación de agregados proteicos, existen varias técnicas disponibles para detectar la actividad antimicrobiana de las cepas de BAL, a continuación se describen los que comúnmente se utilizan para su estudio (O'Bryan et al., 2015).

2. 4. 1 Prueba de la gota

El spot test, o "prueba de la gota" es una técnica química, simple y eficiente en la que los ensayos analíticos se ejecutan en una o varias gotas de una solución química, sobre superficies solidas impermeables como agar o papel filtro, sin utilizar cualquier instrumentación sofisticada. La técnica consiste en la inhibición del crecimiento de una cepa sensible, por una bacteria productora de una sustancia antagonista, en la cual se toma una pequeña cantidad (2µl) de una suspensión bacteriana de la cepa productora y se deposita dejando caer la gota de esta suspensión sobre la superficie de una placa con el medio agar óptimo previamente inoculado con aproximadamente

($1x10^8$ UFC / ml) del microorganismo sensible con el que se desea estudiar la bacteria productora de esta sustancia, se deja incubar 24 o hasta 72 horas a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo estudiado (35 ± 2° C), después de este periodo se observará una zona clara de inhibición de al menos 2mm para considerar como positiva la prueba (Hernández et al., 2005; Milillo et al., 2013).

2. 4. 2 Ensayo de difusión en disco

El método de difusión del disco se desarrolló originalmente como un medio para medir el efecto de un antibiótico contra las bacterias cultivadas en cultivo (Bauer 1966). La bacteria en cuestión se inhibe de forma uniforme a través de una placa de cultivo. A continuación, se coloca sobre la superficie del agar un disco de papel de filtro de 6 mm, impregnado con una dilución conocida del compuesto antimicrobiano a analizar. El compuesto se difunde desde el papel de filtro al agar. La concentración del compuesto será más alta al lado del disco y disminuirá a medida que aumente la distancia del disco. Si el compuesto es efectivo contra bacterias a cierta concentración, no crecerán colonias donde la concentración en el agar sea mayor o igual a la concentración efectiva. Esto crea una zona de inhibición medible. Por lo tanto, el tamaño de la zona de inhibición es una medida de la efectividad del compuesto: cuanto mayor es el área despejada alrededor del disco filtrante, más eficaz es el compuesto en concentraciones más bajas contra la especie bacteriana de prueba (O'Bryan et al., 2015).

El método de difusión en disco se ha adaptado para su uso en la prueba de cultivos o compuestos para la acción antimicrobiana colocando una alícuota de cultivo o compuesto en discos abrasivos de 6 mm de diámetro, que se dejan secar durante 10 minutos. El organismo sensible se extiende, se coloca en placas sobre el medio apropiado y los discos se colocan asépticamente sobre la superficie del agar; las placas se incuban durante la noche y se miden las zonas de inhibición (Meena y Sethi, 1994). Tadese et al. (2005) midieron este método un tanto sumergiendo discos de filtro estériles en el caldo de cultivo de BAL que se había incubado durante 24 horas. Estos discos se colocaron en agar solidificado Mueller-Hinton sembrado con cultivos de organismos de prueba de 12-14 h; las placas se incubaron durante la noche y se midieron las zonas de inhibición.

2.4.3 Ensayo de difusión en pozo

El método de difusión en pozo es una ligera modificación de la técnica de difusión en disco, y actualmente es recomendado por el subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS (por su siglas en inglés: National Committee for Clinical Laboratory), de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos (NCCLS, 1998). El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a

ensayar, sobre el cual se hace un pozo de 6 a 8 mm de diámetro impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (NCCLS, 1998; Hacek et al., 1999).

En el caso de evaluar varias sustancias o concentraciones, los pozos deben colocarse en forma equidistante, posteriormente se incuba a la temperatura adecuada por 24 horas (Mbata et al., 2006; Mallesha et al., 2010) luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias o concentraciones sobre el microorganismo sensible estudiado, con el antibiótico control, la lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia. Algunos autores refrigeran las cajas a 4°C para permitir la predifusión de los extractos antes de la incubación (Daferera et al., 2004).

En general se propone utilizar los métodos de difusión (en disco o en pozo) para estudiar compuestos polares. Las metodologías aplicadas siempre consideran la estandarización de la concentración bacteriana a utilizar, con el ánimo de evitar un crecimiento exhaustivo, que impida el análisis de los resultados o proporcione resultados errados lo cual puede variar significativamente la respuesta del extracto utilizado, indicando la necesidad de utilizar concentraciones mayores de éste para inhibir el crecimiento del microorganismo. La concentración de bacterias empleada para el estudio de susceptibilidad en el laboratorio ha sido estandarizada a un equivalente de 0.5 en la escala de Mac Farland, el cual corresponde a $1X10^8$ UFC/ml. Es recomendable tomar el inoculo de cultivos en la fase exponencial de crecimiento y siempre tomar 4 o 5 colonias de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas (Anon, 2003).

Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnica son el agar Mueller-Hinton y agar Tripticasa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras, algunos investigadores utilizan agar nutritivo (EUCAST, 2000; Doughari, 2006).

2. 5 Prueba de resistencia a antibióticos

Desde el punto de vista de la seguridad, cuando una cepa de batería demuestra la resistencia a los antimicrobianos mediante métodos fenotípicos, es envidiable monitorear la base molecular de esta resistencia. A este respecto, el desempeño de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos podría considerarse un criterio de selección esencial para los cultivos probióticos como los son las bacterias ácido lácticas y una guía efectiva para el tratamiento antimicrobiano específico. En consecuencia, las estrictas medidas de control de calidad y la caracterización y el mantenimiento adecuados de las cepas de cultivo inicial durante la producción de productos fermentados y farmacéuticos son obligatorias, siendo deseable que las cepas que serán utilizadas como probióticas no presenten resistencia del tipo cromosómica (Sharma et al., 2015). La determinación de la posible virulencia de los microorganismos es necesaria para garantizar la seguridad, incluso entre un grupo de bacterias GRAS (Joint FAO/WHO, 2002)

Sin embargo existen diferentes técnicas de laboratorio que pueden ser utilizadas para evaluar *in vitro* la resistencia de las bacterias a diferentes agentes antimicrobianos. Entre estas técnicas, la prueba de susceptibilidad de

difusión en disco (técnica de Kirby-Bauer) es la más común (Jorgensen y Turnidge, 2007).

2.6 Microorganismos patógenos de importancia en alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos son un importante problema de salud pública a nivel mundial y conllevan una gran carga de morbilidad, siendo los productos lácteos, un medio de cultivo para el crecimiento de microrganismos patógenos y de deterioro representando del 1.5% a 6.8% del peligro biológico para la intoxicación alimentaria (Azar y Rofehgari-Nejad, 2009). El principal determinante que influye en la calidad y seguridad de los lácteos sin duda, es la leche cruda, siendo la principal fuente de contaminación la mastitis bovina, cuyo agente etiológico más importante es *Staphylococcus aureus*, por otro lado, *Salmonella* spp., *E. coli*, *Campylobacter* y *Brucella*, son los patógenos en queso principalmente de tipo artesanal que mayormente se asocian a los brotes de enfermedad por intoxicaciones de tipo alimentarias en un 29% en el mundo (Dominguez et al, 2009; Gould et al., 2014; Parrilla et al. 2016).

En el año 2017, el boletín del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica reportó para la República Mexicana 1, 380, 630 de casos de infecciones intestinales, representando para el estado de Baja California el 2.6% de los casos, siendo el 0.035% por Salmonelosis, el 0.02% por *Staphilococcus aureus* y el 0.0003% por Shigelosis. (SINAVE/DGE/Salud, 2018).

Los productos lácteos han sido reconocidos por ser susceptibles a la contaminación por microorganismos deterioradores. La contaminación microbiana puede ocurrir en cualquier etapa, desde la producción del queso hasta el consumo del mismo, demostrándose que la contaminación cruzada es la principal fuente de microorganismos indeseables en quesos hechos a partir de leche pasteurizada y no pasteurizada. De igual manera, el queso fresco artesanal, con malas condiciones de higiene durante el proceso de maduración incrementa la posibilidad de tener un producto perjudicial, ocasionando una pérdida económica importante para los productores, y un riesgo para la salud de los consumidores (Borges 2006; Carrasco et al., 2012).

2. 6. 1 *Salmonella*

Salmonella spp. es mundialmente encontrada en alimentos, siendo un agente microbiano envuelto en brotes de enfermedades de origen alimenticio, comúnmente asociados a la ingestión de alimentos de origen animal, como pollo, huevos, carne, leche y productos lácteos (CDC 2004; Dalton *et al*. 2004; Colak, 2006; Arques et al, 2015).

*Salmonella e*s un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Es móvil y no fermenta la lactosa o lo hace lentamente. Generalmente produce ácido y gas de la glucosa, a excepción de Salmonella entérica serotipo *Typhi* que no produce gas ni utiliza lactosa (Strockbine et al., 2015). Tiene gran capacidad de adaptación a ambientes adversos, como altas concentraciones de sal, valores de pH de 4,5 a

9, temperaturas entre 6-42 °C y valores de actividad de agua igual o superiores a 0,93 (D'Aoust, 2000; Holt y col., 2000). Actualmente se divide en 2 especies: *Salmonella enterica*, con 6 subespecies y *Salmonella bongori*, mucho menos frecuente. Cada subespecie, a su vez, se divide en serovariedades o serotipos y la mayoría pertenecen a *Salmonella entérica* subsp. *Entérica* (Elika, 2013; Talaro y Chess, 2015).

La contaminación por *Salmonella* spp, puede ocurrir en leche y quesos frescos, de larga maduración y prolongado tiempo de almacenamiento debido a que los rumiantes productores de leche son un reservorio común, alojando esta bacteria en el rumen y heces, además de una mala manipulación y malas condiciones higiénicas de la materia prima (leche) durante el proceso de su manufactura (Oliveira et al., 2011; Pointon et al., 2012).

2. 6. 2 *Staphilococcus aureus*

Staphilococcus aureus es uno de los más importantes patógenos humanos y animales. El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 µm, se caracteriza por su tipo de agrupación, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre) (Kuroda, 2001; Harris, 2002). Tiene un amplio conjunto de mecanismos de virulencia asociados con la infectividad, la producción de toxinas y la resistencia a los

antimicrobianos (Argudin et al., 2010). Entre las toxinas producidas por *S. aureus*, las enterotoxinas estafilocócicas son una preocupación, ya que al producirse en alimentos, pueden causar intoxicación alimentaria, siendo una de las enfermedades más prevalentes en todo el mundo transmitidas por alimentos como la leche cruda y sus derivados siendo los involucrados más frecuentes en estos brotes (ECDC, 2015; ANVISA, 2015). La intoxicación causada por enterotoxinas estafilocócicas (SE) producidas por *S. aureus* en el producto lácteo causa diarrea y vómitos severos solo horas después de la ingestión (Argudín et al., 2010).

2. 6. 3 *Escherichia coli*

El grupo de coliformes fecales, se define como barras Gram-negativas móviles, con flagelos, aerobias y anaerobias facultativas, no esporuladas, que pueden presentar cápsula, muy resistentes a la temperatura y a los agentes externos, producen CO_2 a partir de lactosa y crece entre 8 y 46 °C, pH entre 4,4 y 10, en medios con valores mínimos de actividad de agua 0,95; (Martínez-Medina et al., 2009; Horcajo et al., 2012). *E. coli* es una especie predominante entre los varios tipos de bacterias Gram-negativas, anaerobias facultativas, y parte de la microbiota de humanos y animales de sangre caliente. Esta bacteria también se puede encontrar en agua, suelo, vegetales y alimentos comúnmente de origen animal como leche y sus derivados (Talaro y Chess, 2015).

III. MATERIALES Y METODOS

3. 1 Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Leche del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California (IICV-UABC) en la ciudad de Mexicali, Baja California.

3. 2 Fuente de las bacterias del género *Lactobacillus*

Se obtuvieron a partir de aislamientos de queso prensado y oreado de 24h de elaboración con de leche cruda de vaca de unidades productoras de la comunidad de Ojos Negros, municipio de Ensenada, Baja California. Las muestras se transportaron y almacenaron a 4°C hasta el momento de su análisis.

Las muestras de queso fueron procesadas de acuerdo al protocolo de la NOM-110-SSA1-1994. Brevemente, 10 g de queso fueron pesados en una báscula (Triple Beam 700/300 series, Ohaus; USA) para homogenizarla en 90 ml de agua peptonada bufferada en stomacher (Seward, UK) a 200 rpm por un minuto. Se realizaron cinco diluciones seriadas (10^1 a 10^5) utilizando solución buffer, posteriormente un mililitro de cada dilución fue colocada en cajas petri por duplicado con medio agar Man Rogosa Sharpe (MRS: Difco) con la técnica de vaciado en placas e incubándolas por 48 horas a 35 ± 2°C bajo condiciones de anaerobiosis (Carafa et al., 2015). De la última dilución desarrollada de cada

placa de medio a agar (10^{-5}), se tomaron 6 colonias para ser resembradas, y preseleccionar aquellos aislados que concordaran con las características fenotípicas tales como: catalasa (-) utilizando peróxido de hidrogeno al 3%, prueba de KOH (-) con hidróxido de potasio al 3%, tinción Gram (+) y morfología (coco, cocobacilo, bacilo), desarrollo de CO_2 a partir de glucosa y PCR rDNA 16S (DNeasy blood &Tissue Kit-QIAGEN) con compatibilidad del 90100% con el género *Lactobacillus*; resultando entonces catorce bacterias de

Cuadro 2. Identificación fenotípica y genotípica de especies de *Lactobacillus* (Lb) aisladas de queso artesanal de Ojos Negros.

ID Lab	GRAM	MORFOLOGÍA	KOH	Cat	Oxi	CO_2	ID PCR	PCR-Lb
82MRS	pos	cocos	(-)[1]	(-)	(-)	(-)	3	*Lb. plantarum*
83MRS	pos	bacilos	(-)	(-)	(-)	(-)	4	*Lb. plantarum*
82MRS	pos	bacilo	(-)	(-)	(-)	(-)	6	*Lb. plantarum*
81MRS	pos	Bacilos	(-)	(-)	(-)	(+)[2]	7	*Lb. plantarum*
83MRS	pos	Bacilos	(-)	(-)	(-)	(+)	8	*Lb. plantarum*
83MRS	pos	Bacilos alargados	(-)	(-)	(-)	(+)	9	*Lb. plantarum*
83MRS	pos	Bacilos	(-)	(-)	(-)	(+)	10	*Lb. plantarum*
99MRS	pos	cocobacilos	(-)	(-)	(-)	(-)	36	*Lb. zeae*
99MRS	pos	cocobacilos	(-)	(-)	(-)	(-)	39	*Lb. plantarum*
100MRS	pos	cocos	(-)	(-)	(-)	(-)	41	*Lb. plantarum*
99MRS	pos	bacilos	(-)	(-)	(-)	(+)	44	*Lb. paracasei*
100MRS	pos	bacilos	(-)	(-)	(-)	(+)	45	*Lb. paracasei*
100MRS	pos	bacilos	(-)	(-)	(-)	(-)	47	*Lb. zeae*
101MRS	pos	cocobacilos	(-)	(-)	(-)	(-)	48	*Lb. paracasei*

[1](-) reacción negativa, [2](+) reacción positiva

este grupo (Cuadro 2), de las cuales nueve se identificaron como *Lactobacillus plantarum (64%),* tres *Lactobacillus paracasei (22%)* y dos *Lactobacillus zeae* (14%). Las cepas de Lactobacillus se activaron de nuevo en caldo MRS

(DIFCO, USA) incubadas a 35±2°C por 24 horas en anaerobiosis para su posterior estudio en los ensayos para detectar la actividad antimicrobiana, actividad acidificante: pH mediante potenciómetro (Multi-parameterPCSTestrTM35, EUTECH Instruments, USA), determinación de ácido láctico (NOM-155-SCFI-2012) y sensibilidad a antibióticos.

3. 3 Fuente de las bacterias patógenas

Las bacterias patógenas utilizadas como control (*Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Staphilococcus aureus* 9091, *Escherichia coli* 1822B) para el estudio de la actividad antimicrobiana fueron obtenidas del cepario del laboratorio de biología molecular del IICV-UABC.

Para la reactivación inicial se siguió la metodología por Hernández et al. (2005) inoculó una alícuota congelada con glicerol de cada bacteria en medio líquido agar infusión cerebro corazón (Becton Dickinson, Alemania) e incubado por 24 horas a 35±2°C con agitación de 250 rpm (VWR Incubatig Orbital Shaker, serie 070809005, USA) para su posterior uso, se almacenaron a 4° C por un tiempo no mayor a 24 horas.

3. 4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *Lactobacillus* por ensayo de difusión en disco

El efecto de la actividad inhibitoria de los sobrenadantes con las diferentes especies de *Lactobacillus* se evaluó siguiendo el protocolo de Bauer (1966) y Sánchez y Tromps (2014) sobre microorganismos patógenos de

importancia alimentaria tales como: *Salmonella tiphymurium (*ATCC14028), *Stahpylococcus aureus* 9091A y *Escherichia coli* 1822B las cuales fueron cultivadas para su reactivación en caldo infusión cerebro corazón (Becton Dickinson, Alemania) incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas.

Las 14 cepas de *Lactobacillus* se cultivaron por 24 horas en caldo e incubando a 35 ± 2 °C en un medio MRS (DIFCO, USA) para obtener el sobrenadante por medio de centrifugación 12000 x g en un tiempo de 10 minutos a 4 °C, y posteriormente esterilizar el sobrenadante bajo filtración usando una membrana de 0.25 µm (Puradisc, GE Healthcare, UK).

Los microorganismos patógenos indicadores fueron subcultivados en agar infusión cerebro corazón, fundido a una densidad óptica de 0.5 ($O.D._{600}$) y se vertieron 12 ml en placas petri estériles, se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Una vez solidificado el medio infusión cerebro corazón, se emplearon discos de papel filtro estériles (Whatman, GE Healthcare, UK) y se humedecieron con 35 µl del sobrenadante de cada una de las catorce cepas de *Lactobacillus*; con una pinza de metal estéril, se colocaron los discos de papel filtro humedecidos sobre la superficie de las placas con el microorganismo patógeno ya inoculado y se incubaron por 24 horas a 35 ± 2 °C. La evaluación de la actividad inhibitoria se expresó por la presencia de halos de inhibición mayores a 1mm de diámetro como patrón de referencia de acuerdo a la metodología utilizada por Sánchez y Tromps (2014). Los ensayos se condujeron por duplicado.

3.5 Evaluación de la actividad acidificante de las especies de *Lactobacillus*

Para evaluar la capacidad de acidificación de las especies de *Lactobacillus* se siguió el protocolo de la NOM-155-SCFI (2012), para medir acidez titulable expresada como ácido láctico, a fin de excluir el efecto inhibitorio del metabolito producto de la fermentación de ácidos orgánico como es el ácido láctico en menor tiempo de desarrollo (Kummar and Kummar 2015). Se inocularon 14 frascos estériles con 80ml de medio Skimmilk (caldo MRS, DIFCO + leche desnatada) a partir de un cultivo fresco de 24 horas con cada una de las cepas de *Lactobacillus (1% v/v).* Se incubaron a 35 ± 2°C por 24 horas. Posteriormente a las 2 horas se les realizó mediciones de pH y acidez titulable y consecuentemente 6, 18 y 24 horas después de inoculadas. El porcentaje de acidez titulable se expresó como ácido láctico.

El ensayo consistió en extraer asépticamente 10 ml de caldo Skimmilk y depositarlo en un vaso estéril de 50mL, para realizar la prueba de pH mediante un potenciómetro (Multi-parameter PCS Testr^{TM}35, EUTECH Instruments).

Para la determinación del ácido láctico por el método de titulación, se tomó un ml del mismo medio caldo Skimmilk y se diluyó llevando a 9 ml de agua destilada estéril para obtener un volumen final de 10 ml. Añadiendo una gota de solución de fenoftaleína al 1%, para su titulación con hidróxido de sodio 0.1 N, hasta la aparición de un color rosado que persistía de 5 a 30 segundo, los resultados se reportaron en % de ácido láctico. Todos los ensayos se llevaron por duplicado.

3. 6 Prueba de sensibilidad a antibióticos en *Lactobacillus*

Se utilizó el método de difusión en agar (Ferrari et al., 2016). Los sensidiscos con los antibióticos utilizados (cuadro 3) fueron los recomendados por el Instituto de estándares de clínicas y laboratorios (CLSI, 2012).

Cuadro 3. Antibióticos utilizados en la prueba de sensibilidad a antibióticos.

Amoxicilina+ac. Clavulanico	20/10µg
Eritromicina	15µg
Penicilina	10µg
Amoxicilina	10µg
Cotrimoxazol	25µg
Cefalexina	30µg
Cefazolin	30µg
Cefuroxima	30µg
Cloranfenicol	30µg
Ciprofloxacina	5µg
Ofloxacina	5µg
Piperaciclina	100µg
Azitromicina	15µg
Tetraciclina	30µg

Retomado de Arkay Healthcare, India. 2009

Los inóculos con las especies de *Lactobacillus* desarrolladas en 24h en medio agar MRS (DIFCO, USA), se llevaron a una concentración igual a la del estándar 0,5 de McFarland (Becton Dickinson, USA) en 4mL de agua destilada estéril, para luego sembrarlas sobre la superficie de una placa seca de agar Müeller-Hinton empleando hisopos estériles para cada una. Una vez seca la superficie de la placa se les aplicó los discos de antibióticos, incubando a 35+2ºC por 24 horas. Cada plato es observado en una luz indirecta y cada halo de inhibición es medido utilizando una regla graduada. Los diámetros alrededor

de cada disco son medidos y su interpretación se basó en la guía publicada por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2015) donde halos de inhibición ≤14mm son consideradas resistentes, halos de 15-22 mm moderadamente sensibles y halos de inhibición ≥23 mm se consideran sensibles.

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Actividad inhibitoria de las cepas de *Lactobacillus*

En el Cuadro 4 se presenta la actividad inhibitoria de 14 cepas de *Lactobacillus* contra tres (*Staphylococcus aureus, Salmonella tiphymurium y Escherichia coli* bajo el método de difusión en disco.

Cuadro 4. Actividad inhibitoria que presentan 14 cepas de *Lactobacillus* contra patógenos probados por método de difusión en disco.

		microorganismo patógeno		
ID. PCR	ESPECIE BAL	*Staph. aureus*	*Salmonella tiphymurium*	*E. coli*
39	*L. plantarum*	-	+++	-
41	*L. plantarum*	-	+++	-
3	*L. plantarum*	++	-	-
6	*L. plantarum*	++	-	-
7	*L. plantarum*	++	-	-
8	*L. plantarum*	+	-	-
4	*L. plantarum*	-	-	-
9	*L. plantarum*	-	-	-
10	*L. plantarum*	-	-	-
44	*L. paracasei*	-	++	-
48	*L. paracasei*	-	-	-
45	*L. paracasei*	-	-	-
47	*L. zeae*	-	-	+++
36	*L. zeae*	-	-	-

+, <10 mm de inhibición; ++, entre 10 y 11 mm de inhibición; +++, ≥ 11 mm de inhibición; y -, sin inhibición.

El 64% (9/14) de las cepas presentaron actividad inhibitoria de entre 9 a 12 mm de diámetro. Donde cuatro cepas de *Lactobacillus (Lb)* de la especie *plantarum* (29%) mostraron capacidad de inhibir a *Staphilococcus aureus* cifras que resultaron similares a los diámetros reportados por Hernández et al., (2005) y Mejri y Hassouna (2016) de 9 a 10 mm; además de señalar que la especie *Lb. plantarum* mostró mejor capacidad para inhibir bacterias de pared celular Gram+ que Gram-, esto se explica debido a que bacterias Gram + en su estructura morfológica carecen de una membrana externa que les proteja su pared celular de la acción de compuestos antimicrobianos.

Tres cepas de *Lactobacillus (2 plantarum* y 1 *paracasei)* mostraron capacidad de inhibir a *Salmonella typhimurium.* Lozo et al., (2004) y García et al., (2016), mencionan que estas dos especies de *Lactobacillus son las que* presentan mayor capacidad de inhibir microorganismos tales como: *Salmonella, Staphylococo aureus, Pseudomonas* en quesos, debido a su aptitud por desarrollar ácidos orgánicos y bacteriocinas, y cuyo mecanismo favorece una ambiente inapropiado para los patógenos dañando su membrana celular.

Por otra parte en nuestro trabajo *Lactobacillus paracasei* y *zeae*, fueron las especies que solo inhibieron a *Escherichia coli.* Estos hallazgos son similares a los estudios reportados por Bendali et al. (2011), Capra et al. (2014) y Dolas y Deshpande (2016) quienes observaron halos de inhibición de 9 y 12mm de contra este patógeno.

Los resultados muestran que la mezcla de algunas cepas de *Lactobacillus* pudieran ser agregadas en la etapa de fermentación de la leche durante el proceso de elaboración del queso, como cepas iniciadoras de ácido láctico con el fin de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos aquí analizados y mejorar la vida de anaquel del producto y reducir posible riesgo de salud (Alejo et al., 2015).

4. 2 Actividad acidificante de cepas de *Lactobacillus* a diferentes horas de cultivo.

El cuadro 5, presenta la producción de acidez y ácido láctico en 14 cepas de *Lactobacillus* a diferentes horas de cultivo. En el que se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de acidez de las 3 especies analizadas. Sin embargo se observa una tendencia a desarrollar acidez conforme transcurren las horas de incubación. Bajo condiciones de ≤ pH 3 no existe crecimiento de algunos microorganismos patógenos tales como *Escherichia coli*, *Salmonella spp y Staphylococcus aureus* (Torres, 2013; D'Aoust, 2000; Holt y col., 2000; Martínez-Medina et al., 2009; Horcajo et al., 2012). Considerando que en nuestro estudio los promedios de acidez de las 3 especies evaluados a las 24 horas se encuentran por debajo de un pH 3 lo cual confirma que los *Lactobacillus* identificados a partir de las muestras de queso artesanal pueden para ser utilizado como probióticos.

Con respecto a la producción de ácido láctico, se observó una correlación positiva entre la producción de ácido láctico y las horas de

incubación evaluada hasta las 24 horas. Las cepas de *Lactobacillus* en este estudio presentaron capacidad de acidificar (ácido láctico 0.226 y 0.250 g/100)

Cuadro 5. Producción de acidez y ácido láctico en 14 cepas de *Lactobacillus (Lb)* a diferentes horas de cultivo

ID.PCR	*Especies Lb*	Producción de acidez (pH)				Producción de Ácido láctico g/100			
		2h	6h	18	24	2h	6h	18	24
39	*L. plantarum*	4.17	3.9	3.86	3.12	0.099	0.099	0.2295	0.2475
41	*L. plantarum*	4.17	3.935	3.825	3.245	0.09	0.1035	0.252	0.2475
3	*L. plantarum*	5.345	3.48	2.615	2.32	0.054	0.1035	0.2385	0.2835
6	*L. plantarum*	5.125	3.27	2.52	2.315	0.0495	0.1395	0.2835	0.2745
7	*L. plantarum*	5.1	3.115	2.48	2.33	0.0405	0.126	0.288	0.2925
8	*L. plantarum*	4.84	3.05	2.485	2.315	0.0495	0.18	0.2835	0.252
4	*L. plantarum*	5.11	3.74	2.94	2.56	0.045	0.081	0.171	0.2025
9	*L. plantarum*	4.87	3.45	2.74	2.555	0.054	0.117	0.243	0.225
10	*L. plantarum*	5.145	3.87	2.49	2.405	0.0585	0.1125	0.2655	0.288
	Promedios	**4.87**	**3.53**	**2.88**	**2.57**	**0.06**	**0.11**	**0.25**	**0.25***
44	*L. paracasei*	4.13	3.88	3.84	3.09	0.0585	0.0945	0.261	0.2115
48	*L. paracasei*	4.145	3.91	3.845	2.365	0.072	0.1354	0.225	0.2295
45	*L. paracasei*	4.15	4.025	3.845	3.425	0.0675	0.1035	0.234	0.2385
	Promedios	**4.14**	**3.93**	**3.84**	**2.96**	**0.06**	**0.11**	**0.24**	**0.226***
47	*L. zeae*	4.145	3.96	3.84	2.565	0.0585	0.1125	0.2385	0.252
36	*L. zeae*	4.22	3.91	3.875	3.22	0.099	0.099	0.2295	0.247
	Promedios	**4.18**	**3.93**	**3.85**	**2.89**	**0.078**	**0.10**	**0.23**	**0.249***

[1] Media estadística (X)

* Valor p <0.05 Análisis de regresión

el ambiente en el cual se desarrollan, esta capacidad es de suma importancia para que estos puedan ser utilizados como cultivos iniciadores (Karimi et al., 2012). Estos mismos autores mencionan que concentraciones de ácido láctico por debajo de 0.24 g/100 y pH <5.4 después de seis horas de incubación inhiben a los microorganismos patógenos. Otros estudios han señalado que bacterias como *Salmonella, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus y E.coli* presentan menos probabilidad a desarrollarse debido que su tolerancia mínima se encuentra entre valores de pH de 4.9 a 5.9 en quesos (Ramírez-López, 2016; Vélez, 2014).

4. 3 Sensibilidad a antibióticos

A fin de conocer los efectos inhibitorios como posibles candidatas a probióticos en cepas de *Lactobacillus* probadas contra siete antibióticos de acción sobre pared celular, cuadro 6. Se percibe que la resistencia de las cepas de *Lactobacillus* a Cefalosporina fue la más frecuente (43%), seguida de Penicililina y Amoxicilina (14%). Sin embargo la ausencia de resistencia adquirida a antibióticos es uno de los primeros criterios de seguridad que deben controlarse en las BAL como candidatas a probióticos (Monteagudo-Mera et al., 2012; Sharna et al., 2016). Una *resistencia* adquirida a los antibióticos es una condición intrínseca que se encuentra mayormente en las especies bacterianas del grupo gram negativas por mencionar *Aeromonas, Escherichia, Klebsiella*, *Vibrio, Salmonella* y en gram positivas como *Listeria, Staphylococos*, quienes generalmente codificaran antibióticos mediante genes de resistencia que al ser lisadas su ADN queda libre en

Cuadro 6. Cepas de *Lactobacillus* resistentes antibióticos que actúan sobre la pared celular

ID. PCR	Cepas	Antibióticos de acción en pared celular						
		PG/P**	AC/AMC	AX/AMX	PC/PI	CF/CFZ	CP/CFM	CR/XM
39	*Lb. plantarum*	+	-	-	-	-	+	-
41	*Lb. plantarum*	-	-	-	-	-	+	-
3	*Lb. plantarum*	-	-	-	-	-	-	-
6	*Lb. plantarum*	-	-	-	-	-	-	-
7	*Lb. plantarum*	-	-	-	-	-	-	-
8	*Lb. plantarum*	-	-	-	-	-	-	-
4	*Lb. plantarum*	+	-	-	-	-	-	-
9	*Lb. plantarum*	-	-	-	-	-	-	-
10	*Lb. plantarum*	-	-	-	-	-	-	-
44	*Lb. paracasei*	-	-	+	-	-	+	-
48	*Lb. paracasei*	-	-	-	-	-	-	-
45	*Lb. paracasei*	-	-	-	-	-	+	-
47	*Lb. zeae*	-	-	-	-	-	+	-
36	*Lb. zeae*	-	-	+	-	-	+	-
	Total	2(14%)	-	2(14%)	-	-	6(43%)	-

**(PG/P) Penicilina 10µg; (AC/AMC) Amoxicilina+Ac. Clavulanico 20/10 µg; (AX/AMX) Amoxicilina 10µg; (PC/PI) Piperaciclina 100 µg; (CF/CFZ) Cefazolin 30 µg; (CP/CFM) Cefalexina 30 µg; (CR/XM) Cefuroxima 30 µg

transformación o por transducción es incorporado por las BAL confiriendo esa resistencia natural sin haber estado expuestas a los fármacos (Patel et al., 2012; Valenzuela et al., 2016). Por otra parte las cepas de *Lactobacillus* que resultaron inhibidas frente a antibióticos como PG/P, AC/AMC, AX/AMX, PC/PI, CF/CFZ, CP/CFM, CR/XM, fueron cepas de *Lb plantarum* ID: 3, 6, 7, 8, 9, 10 y *Lb paracasei* ID: 48. Según Venegas et al., (2012) y Valenzuela et al., (2016) la sensibilidad a antibióticos es un tema controvertido, ya que los probióticos no deberían presentar resistencia para no convertirse en vehículos de transferencia de genes de resistencia.

El cuadro 7 muestra las cepas de *Lactobacillus* resistentes con respecto a los antibióticos que actúan a nivel de síntesis de proteína, solo se observó

algún grado de resistencia hacia Eritromicina (35.7%) y Azitromicina (21.4%); es importante señalar que siete de las cepas de *Lactobacillus plantarum, una de paracasei y otra de zeae,* mostraron ser sensibles a los antibióticos TE, CK/C.

Cuadro 7. Cepas de *Lactobacillus* resistentes a antibióticos que actúan sobre síntesis de proteína y ácidos nucleicos

		Síntesis de proteína				Síntesis de ácidos nucleicos		
ID.PCR	Cepas	ER/EM	TE	CK/C	AZ	CT/SXT	CI	OF
39	*Lb. plantarum*	-	-	-	-	-	-	-
41	*Lb. plantarum*	-	-	-	-	-	+	+
3	*Lb. plantarum*	-	-	-	-	-	-	+
6	*Lb. plantarum*	-	-	-	-	-	-	+
7	*Lb. plantarum*	-	-	-	-	-	-	+
8	*Lb. plantarum*	+	-	-	-	-	-	+
4	*Lb. plantarum*	-	-	-	-	-	-	+
9	*Lb. plantarum*	+	-	-	+	-	-	+
10	*Lb. plantarum*	-	-	-	-	-	-	+
44	*Lb. paracasei*	-	-	-	-	-	-	-
48	*Lb. paracasei*	+	-	-	-	-	-	-
45	*Lb. paracasei*	+	-	-	+	-	-	-
47	*Lb. zeae*	+	-	-	+	-	-	-
36	*Lb. zeae*	-	-	-	-	-	-	-
	Promedio	**5(35.7%)**	-	-	**3 (21.4%)**	**-**	**2 (7.1%)**	**8 (89%)**

**(ER/EM) Eritromicina 15 µg; (TE) Tetraciclina 30 mg; (CK/C) Cloranfenicol 30 µg; (AZ) Azitromicina 15 µg; (CT/SXT) Cotrimoxazol 25 µg; (CI) Ciprofloxacina 5 µg; (OF) Ofloxacina 5 µg

Contrario a los hallazgos obtenidos en antibióticos que actúan a nivel de síntesis de ácidos nucleicos, en los cuales se observa una fuerte resistencia hacia Ofloxacina (89%) por parte de las especies de *Lb. plantarum.* Al respecto Patel et al., (2012) reportan para *Lb plantarum* un prevalencia del 85% de resistencia a Ciprofloxacina en diversos productos fermentados, condición que solo se detectó en una de nuestras cepa de *Lb plantarum* (ID:41) con 7.1% de

resistencia, lo que indica que esta no puede ser utilizada como candidata a probiótico.

Estos resultados son similares a los documentados en diferentes productos fermentados y probioticos con una susceptibilidad intrínseca a antibióticos como, Penicillina, Cloramfenicol, Eritromicina, Streptomicina, Gentamicina, Teraciclina; así como una resistencia a Glycopeptidos y Cefalosporinas de 1era generación, Aminoglicocidos (Streptomicina, Gentamicina), Fluoroquinolones (Ciprofloxacina, Ofloxacina), en diferentes *Lactobacillus*, cuyo perfiles de resistencia para este trabajo se vinculan a las cepas de *Lb plantarum y paracasei*, en los cuales se les han ubicado los segmento del ADN que puede desplazar un cromosoma a otro (transpones: tet M) así como plásmidos (en el sector tet L), confiriendo resistencia a Tetraciclinas y Eritromicinas en Lb. paracasei; y *Lb plantarum* para Streptomicina, Cloranfenicol, Eritromicna y Ciprofloxacinas (Patel et al., 2012; Lavilla-Lerma et al., 2013; Morandi et al., 2014; Sánchez et al., 2015; da Silva Ferrari et al., 2016).

En este mismo sentido al menos tres cepas de *Lactobacillus* (ID: 39, 44 y 36) mostraran ser sensibles al total de antibióticos que actúan a nivel de síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Estos podrían ser utilizados como cultivos iniciadores en la fabricación de quesos artesanales debido a su naturaleza dominante en la producción de ácidos orgánicos otorgándole al producto seguridad como novedosos probióticos.

V. CONCLUSIONES

- En las tres especies de *Lactobacillus* evaluadas en este estudio (*L. plantarum, L. paracasei* y *L. zeae)* se logró identificar la presencia de actividad inhibitoria contra microorganismos patógenos del género *Salmonella tiphymurium, Staphilococcus aures* y *Escherichia coli.*

- Las cepas autóctonas *Lb plantarum* (ID: 39, 41, 3, 6, 8) poseen características fisicoquímicas de resistencia pH acido, producción de ácido láctico y actividad antimicrobiana que sugieren un potencial uso como probióticos.

- Las cepas *Lb. plantarum* (ID: 39), *Lb. paracasei* (ID:44) y *Lb. zae* (ID:36) demostraron capacidad antimicrobiana al reducir en < de 24 h el pH (3.09 a 3.22) y ácido láctico (0.24 a 0.21%).

- El 57% (n=4) del perfil de sensibilidad a siete antibióticos de pared celular en cada una de las cepas seleccionadas mostró variabilidad en la sensibilidad ante antimicrobianos.

- El 50% (n=2) del perfil de sensibilidad a cuatro antibióticos de acción en síntesis de proteínas, sobre cepas la *Lactobacillus* mostraron ser inhibidas.

- El 33% (n=1) de del total de cepas de *Lactobacillus* mostro un perfil de inhibición hacia tres antibióticos de acción en síntesis de ácidos nucleicos.

- La inclusión de las cepas identificadas como cultivos iniciadores en la fabricación de quesos artesanales sugieren un rendimiento tecnológico novedoso debido a su naturaleza dominante de producir ácidos orgánicos otorgándole al producto cierta seguridad como candidatos a probióticos.

VI.LITERATURA CITADA

Anon, "Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution", Clinical Microbiology and Infection, Vol. 9, pp. 1, 2003

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). 2015. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos–VEDTA. Accessed Ene. 14, 2018. http://u.saude.gov.br/images/ pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015. pdf.

Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. *Toxins*, *2*(7), 1751-1773.

Axelsson L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Von Wright A, eds. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects New York: Marcel Dekker Inc

Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, *32*(1), 134-142.

Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 36:493-496

Belicová, A., Mikulášová, M., & Dušinský, R. (2013). Probiotic potential and safety properties of Lactobacillus plantarum from Slovak Bryndza cheese. *BioMed research international*, *2013*.

Bemena, L. D., Mohamed, L. A., Fernandes, A. M., & Lee, B. H. (2014). Applications of bacteriocins in food, livestock health and medicine. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, *3*(12), 924-949.

Beshkova, D., & Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*, *12*(4), 419-432.

Borges M. F. 2006. Diagnóstico da contaminacao por bacterias patogénicas em uma industria procesadora de queijo de coalho e deteccao de genes asociados a fatores de virulencia. PhD thesis, Universidad Estadual de Campinas, Campinas, Brasil. 199pp

Carminati, D, Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suárez, V., & Reinheimer, J. (2010). Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. In F. Mozzi, R. R. Raya, G. M. Vignolo (Eds). Biotechenology of Lactic Acid Bacteria: Novel Application (pp. 177-192). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.

Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: a review. Food Research International, 45(2), 545-556.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2013. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks-United States, 2013: Annual Report. (Available at: http://www.cdc. gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2013-508c.pdf (accessed 25.03.16.))

Centers for disease control and prevention (CDC) 2004. *Salmonella* surveillance: Annual Summary. Atlanta: *United States Department of Health and Human Services.* Available online: www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2004/Salmonellaintroduction2004.pdf

Colak H., Hampikyan H., Bingol E., Ulusoy B. 2006. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. Food control 18(5), 576-579

Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat. Rev. Microbiol. 3: 777-788.

Crittenden R. 2009. Incorpotating probiotics into foods. En: Lee YK, Salminen S. (eds) Handbook of probiotics and prebiotics, 2nd ed. Wiley, Hoboken, NJ. P58-75

da Silva Ferrari, I., de Souza, J. V., Ramos, C. L., da Costa, M. M., Schwan, R. F., & Dias, F. S. (2016). Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of Salmonella typhi in artisanal cheese. *Food microbiology*, *60*, 29-38.

da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., & de Souza Oliveira, R. P. (2014). Overview of Lactobacillus plantarum as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, *64*, 527-536.

Dalton C., Gregory J., Kirki M., Stafford R., Givvney R., Kraa E., Gould D. 2004. Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. Communicable Diseases Intelligence 28(2), 211-224

Danielsen, M., & Wind, A. (2003). Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. International journal of food microbiology, 82(1), 1-11.

Dominguez, M., Jourdan-Da Silva, N., Vaillant, V., Pihier, N., Kermin, C.,Weill, F.X., Delmas, G., Kerouanton, A., Brisabois, A., De Valk, H., 2009. Outbreak of Salmonella enterica serotype Montevideo infections in France linked to

consumption of cheese made from raw milk. Foodborne Pathog. Dis. 6, 121–128.

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA J. 13:162.

El-Ziney, M. G., Debevere, J. M. (1998). The effect of reuterin on Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7 in milk and cottage cheese. Journal of Food Protection, 61, 1275–1280.

Farina, F., Fuser, R., Rossi, M., Scotton, P.G., 2008. Brucellosis outbreak in Treviso province caused by infected cheese from an endemic area. Infez. Med. 16, 154–157.

Feng P., Weagant S. 2002. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliforms bacteria. In: United States Food Drug Administration (Ed) *Bacteriological Analytical Manual online* (8th Edn, Vol IV). AOAC international, Gaithersburg, USA, pp 1-14. Available online: www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4html

da Silva Ferrari, I., de Souza, J. V., Ramos, C. L., da Costa, M. M., Schwan, R. F., & Dias, F. S. (2016). Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of Salmonella typhi in artisanal cheese. *Food microbiology*, *60*, 29-38.

Ferrer, M. D., de Simón, M. (2002). Importancia de E. coli O157: H7 como patógeno emergente de transmisión alimentaria. XIII Congreso de Microbiología de los Alimentos de la SEM. Libro de ponencias, comunicaciones y posters, 203-208.

Gänzle, M.G., 2015. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. Curr. Opin. Food Sci. 2, 106-117.

Gámez, H. J., Jarrín, V. J., & Salas, J. P. (2015). Crecimiento de l. plantarum y efecto sobre e. coli, s. typhimurium, c. perfringens, y s. aureus. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, *13*(2), 57-66.

Garcia, E. F., Luciano, W. A., Xavier, D. E., da Costa, W. C., de Sousa Oliveira, K., Franco, O. L., ... & Saarela, M. (2016). Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected Lactobacillus strains. Frontiers in microbiology, 7, 1371.

García, D.; Jerez, J. (2004). Modelamiento del efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento y producción de BLIS del Lactobacillus casei y optimización de los parámetros propuestos. Chía, Cundinamarca: Veterinaria y Zootecnía ISSN 2011-5415 Vol 8 No.2, julio - diciembre de 2014 ©Universidad de Caldas 33 Universidad de la Sabana. 82p. Trabajo de

Grado (Programa de Ingeniería de Producción Agroindustrial e Ingeniería Industrial).

Garrity G., Bell J., Lilburn T. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology (2nd Edn), Bergueys Outline, New Yok, USA, 401 pp. Available online: http://141.159.157.80/Bergeysoutline/outline/bergeysoutline_5_2004.pdf

Ghanbari, M., M. Jami, W. Kneifel, and K. J. Domig. 2013. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from Sturgeon fish. Food Contr. 32:379–385.

González, L., Sacristán, N., Arenas, R., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2010). Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. *Food microbiology*, *27*(5), 592-597.

González, L., Cuadrillero, A. F., Castro, J. M., Bernardo, A., & Tornadijo, M. E. (2015). Selection of lactic acid bacteria isolated from San Simón da Costa Cheese (PDO) in order to develop an autochthonous starter culture. *Advances in Microbiology*, *5*(11), 748.

Gould, L.H., Mungai, E., Behravesh, C.B., 2014. Outbreaks attributed to cheese: differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized

dairy products, United States, 1998–2011. Foodborne Pathog. Dis. 11, 545–551.

Harris LG, Foster SJ, Richards RG. (2002) An introduction to Staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifyings S.aureus adhesins in relations to adhesion to biomaterials: Review. Eur Cells Mater. jul-dec; 4(2): 39-60

Helmut K., Gottfried U., Jürgen F. (2011). Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. 2nd Ed. Springer. Germany.

Horcajo, P., Domínguez-Bernal, G., De la Fuente, R., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Blanco, J. E., Blanco, M. y col. (2012). Comparison of ruminant and human attaching and effacing Escherichia coli (AEEC) strains. Veterinary Microbiology, 155, 341-348.

Jang, H. H., Ann, S. H., Kim, M. D., & Kim, C. W. (2008). REMOVED: Use of hydrogen peroxide as an effective disinfectant to Actinobacillusureae. *ProcessBiochemistry*, *43*(3), 225-228.

J. H. Doughari, “Antimicrobial Activity of Tamarindusindica Linn. Trop,” Journal of Pharmaceutical Research, Vol. 5, No. 2, 2006, pp. 597-603.

Jose N., Bunt C., Hussain M. 2015. Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. Microorganisms 3:198-212

JOINT FAO/WHO, 2002. Working Group Reporto n Drafting Guidelines for the evaluation of Probiotics in Food (London, Ontario, Canadá).

Jorgensen, J. H., and J. D. Turnidge. 2007. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods, p. 1152–1172. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen,

Karimi R., Mortazavian A. y Amiri-Rigi A. 2012. Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. Food Microbiology, 29, 1-9

Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., & Goossens, H. (2007). Antimicrobial susceptibilities of Lactobacillus, Pediococcus and Lactococcus human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. Journal of antimicrobial chemotherapy, 59(5), 900-912.

Koch, J.,Dworak, R., Prager, R., Becker, B., Brockmann, S., Wicke, A.,Wichmann-Schauer, H., Hof, H., Werber, D., Stark, K., 2010. Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006–2007. Foodborne Pathog. Dis. 7, 1581–1584.

Kumar A, Kumar D. 2015. Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. Anaerobe 33:117-123

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet.; 357: 1225-1240.

Lavilla-Lerma, L., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2013). Characterization of functional, safety, and gut survival related characteristics of Lactobacillus strains isolated from farmhouse goat's milk cheeses. *International journal of food microbiology*, *163*(2-3), 136-145.

Loera-Valenzuela P. B., López-Ortiz C. E., Romero-Vela C. D., Luévanos Escareño M. P., Balagurusamy N., (2016). Mecanismos De Resistencia Intrínseca y Adquirida a Antibióticos En Bacterias. Universidad Autónoma de Coahuila. Revista Medicinas Torren – RMT. Volumen 8, número 2, Diciembre, 2016. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/312324922

León. M. (2012). Evaluación in vitro de cepas de bacterias ácido lácticas nativas con potencial probiótico. Montevideo-Uruguay: Universidad de la República. 54p. Tesis (Licenciatura en Bioquímica).

Ljungh Å, Lan J, and Yanagisawa N. (2002). Isolation, Selection and Characteristics of Lactobacillus paracasei subsp. paracasei F19. Microb Ecol Health Dis; 3: 4-6.

López, J. E., Ochoa, A., Santoyo, G., Anaya, J. L., Medina, E., Martínez, M., & Loeza, P. D. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, *39*(3), 49-57.

Mahrous H, Mohamed A, El-Mongy MA, El-Batal A, Hamza H (2013) Study bacteriocin production and optimization using new isolates of Lactobacillus spp. isolated from some dairy products under diferent culture conditions. Food Nutr Sci 4(3):342

Mallesha, R. S., Selvakumar, D., & Jagannath, J. H. (2010). Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw and fermented products and their antibacterial activity. Recent Research in Science and Technology, 2, 42e46

Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends in food science & technology*, *30*(1), 70-83.

Martínez, F. A. C., Balciunas, E. M., Converti, A., Cotter, P. D., & Oliveira, R. P. S. (2013). Bacteriocin production by Bifidobacterium spp.: a review. Biotechnology Advances, 31, 482–488.

Martínez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M, González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G. y col. (2009). Molecular diversity of Escherichia coli in the human gut: New ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn's disease. Inflammatory Bowel Disease, 15, 872–882

McCormick, A. W., Whitney, C. G., Farley, M. M., Lynfield, R., Harrison, L. H., Bennett, N. M., ... & Samore, M. H. (2003). Geographic diversity and temporal trends of antimicrobial resistance in Streptococcus pneumoniae in the United States. *Nature medicine*, *9*(4), 424.

Mejri, L., & Hassouna, M. (2016). Characterization and selection of Lactobacillus plantarum species isolated from dry fermented sausage reformulated with camel meat and hump fat. *Applied Biological Chemistry*, *59*(4), 533-542.

Milillo, S. R., Story, R. S., Pak, D., O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2013). Antimicrobial properties of three lactic acid bacterial cultures and their cell free supernatants against Listeria monocytogenes. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 48, 63e68.

M. L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.), Manual of clinical microbiology, 9th ed. ASM Press, Washington, D.C.

Morandi, S., Silvetti, T., Miranda Lopez, J. M., & Brasca, M. (2015). Antimicrobial activity, antibiotic resistance and the safety of lactic acid bacteria in raw milk valtellina casera cheese. *Journal of Food Safety*, *35*(2), 193-205.

Mondragón Preciado, G., EscalanteMinakata, P., Osuna Castro, J. A., Ibarra Junquera, V., Morlett Chávez, J. A., Aguilar González, C. N., & Rodríguez Herrera, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, *21*(59).

Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M. R., & Ferrero, M. Á. (2012). In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of functional foods*, *4*(2), 531-541.

Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X., Moore, J. E., & Xu, J. (2011). Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. Current Microbiology, 62(3), 1081-1089.

Nes, I. F., Yoon, S. S., & Diep, D. B. (2007). Ribosomally Synthesiszed Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Biotechnology*, *16*(5), 675-690.

Nishie, M., Nagao, J. I., & Sonomoto, K. (2012). Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol science*, *17*(1), 1-16.

O'bryan, C. A., Crandall, P. G., Ricke, S. C., & Ndahetuye, J. B. (2015). 7-Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: Analytical methods and applications. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality, Elsevier Science, Woodhead Publishing*, 137-151.

Oliveira, C. J. B., Hisrich, E. R., Moura, J. F. P., Givisiez, P. E. N., Costa, R. G., & Gebreyes, W. A. (2011). On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. *Small Ruminant Research*, *98*(1), 64-69.

Patel A. R., Shan N. P. & Prajapati J. B. (2012). Antibiotic Resistance Profile of Lactic Acid Bacteria and Their Implications in Food Chain. World Journal of Dairy & Food Sciences 7 (2): 202-211

Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. In *Microbial cell factories* (Vol. 13, No. 1, p. S3). BioMed Central.

Pointon, A., Kiermeier, A., & Fegan, N. (2012). Review of the impact of pre-slaughter feed curfews of cattle, sheep and goats on food safety and carcase hygiene in Australia. *Food control*, *26*(2), 313-321.

Radulović, Z., Petrović, T., Nedović, V., Dimitrijević, S., Mirković, N., Petrušić, M., & Paunović, D. (2010). Characterization of autochthonous Lactobacillus paracasei strains on potential probiotic ability. Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka, 60(2), 86-93.

Ramirez-López C. y Vélez-Ruiz J. 2016. Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. Informacion Tecnológica. 27(6) 115-128

Requena, T., & Peláez, C. (1995). Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista española de ciencia y tecnología de alimentos*, *35*(1), 19-44.

Rodríguez, E., Arqués, J. L., Rodríguez, R., Nuñez, M., y Medina, M. (2003). Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. Letters in Applied Microbiology, 37, 259–263.

Sánchez, L., & Tromps, J. (2014). Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Revista de Salud Animal*, *36*(2), 124-129.

Schnürer J, Magnusson J (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. Trends Food Sci Tech 16:70–78.

Siamansouri, M., Mozaffari, S., & Alikhani, F. E. (2013). Bacteriocins and lactic acid bacteria. *Journal of Biology*, *2*(5), 227-234.

Speranza, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Altieri, C., & Sinigaglia, M. (2015). Selection of autochthonous strains as promising starter cultures for Fior di Latte, a traditional cheese of southern Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(1), 88-97.

Stolaki M, De Vos WM, Kleerebezem M and Zoetendal EG. (2011) Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects.

Stoyanova, L. G., E. A. Ustyugova, and A. I. Netrusov. 2012. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties. Appl. Biochem. Microbiol. 48:229–243.

Strockbine, N. A., Bopp, C. A., Fields, P. I., Kaper, J. B., & Nataro, J. P. (2015). Escherichia, Shigella, andSalmonella. In Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition (pp. 685-713). American Society of Microbiology.

Talarico, T. L., Casas, I. A., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J. (1988). Production and isolation of reuterin a growth inhibitor produced by Lactobacillus reuteri. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 32, 1854-8

Talaro, K. P., Chess, B. (2015). Foundations in Microbiology. 9th Edition, New York. McGraw Hill Education. 929 pp.

Todorov, S. D., LeBlanc, J. G., & Franco, B. D. G. M. (2012). Evaluation of the probiotic potencial and effect of encapsulation on survival for Lactobacillus plantarum ST16Pa isolated from papaya. Word Journal of Microbiology and Biotechnology, 28, 973-984

Todorov, S. D., & Franco, B. G. M. (2010). Lactobacillus plantarum: Characterization of Species and application in food production. Food Reviews International, 26, 205-229

Urrego M. & Cadavid L. (2005). Efecto sobre la calidad microbiológica, sensorial y reológica, de la aplicación de tres diferentes niveles de ácido láctico en un corte de carne de res (Huevo de solomo). Trabajo de grado Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medellin-Colombia. Pp 72

Vollenweider, S., Grassi, G., König, I., Puhan, Z. (2003). Purification and structural characterization of 3 hydroxypropionaldehyde and its derivates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 3287-3293.

Vollenweider, S., Evers, E., Zurbriggen, K., Lacroix, C. (2010). Unraveling the hydroxypropionaldehide (HPA) system: an active antimicrobial agent against human pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 10315-10322

Yusuf, M. A., & Hamid, T. H. (2013). Lactic acid bacteria: bacteriocin producer: a mini review. *IOSR J Pharm*, *3*(4), 44-50.

Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia*, *2*, 50-56.

Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suàrez, V., Vinderola, G., ... & Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of Lactobacillus plantarum strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, *28*(5), 1033-1040.

Zhou, X., & Yuquin, L. (2015). *Atlas of oral microbiology: From healthy microflora to disease*.

VII. ANEXOS

El diámetro total de inhibición fue medido para cada cepa de *Lactobacillus* contra las siguientes bacterias; *Staph. Aureus, Salmonella tiphymurium y E. coli.* donde un resultado negativo fue aquel que presentó un diámetro de inhibición menor a <0.99 mm y un positivo con un valor por arriba de 1 mm de diámetro, (figura 4).

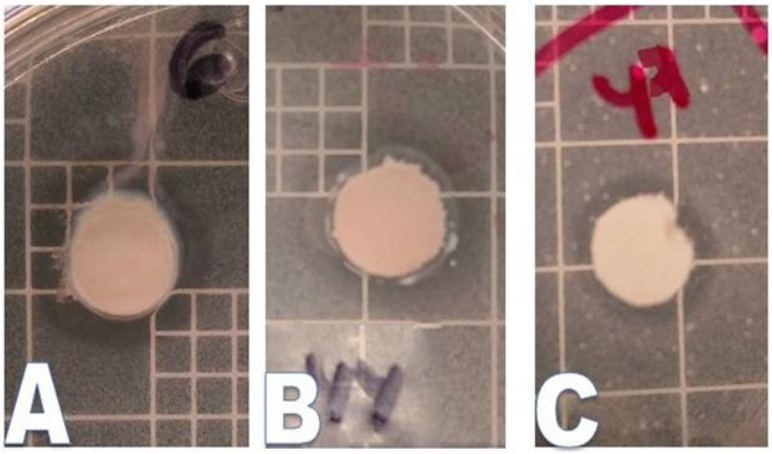

Figura 4. Halo de inhibición de la prueba de actividad antimicrobiana de una cepa de A) *Lb. plantarum* vs. *Staphilococcus aureus*, B) *Lb. paracasei* vs. *Salmonella tiphymurium* y C) *Lb.* zeae *vs. E. coli*.