

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**TESIS**

**EFFECTO BACTERICIDA EN *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 DE ESPECIES DE *Lactobacillus* AISLADAS DE QUESOS ARTESANALES DEL MERCADO FERIALE DEL DISTRITO DE OCONGATE, QUISPICANCHI-CUSCO**

**PRESENTADO POR:**

Br. LISBET BUSTAMANTE FLORES

Br. MARIA TERESA QUISPE JANAHUIRI

**PARA OPTAR AL TÍTULO  
PROFESIONAL DE BIÓLOGO**

**ASESORA:**

Blga. ELENA EMPERATRIZ MADERA  
TUPAYACHI

**CUSCO-PERÚ**

**2025**



# Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

## INFORME DE SIMILITUD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-321-2025-UNSAAC)

El que suscribe, el Asesor .....ELENA EMPERATRIZ MADERA TUPAYACHI.....  
..... quien aplica el software de detección de similitud al  
trabajo de investigación/tesis titulada: .....EFECTO BACTERICIDA EN Escherichia coli ATCC 25922  
y Staphylococcus aureus ATCC 25923 DE ESPECIES DE Lactobacillus AISLADAS DE  
QUESOS ARTESANALES DEL MERCADO FERIA DEL DISTRITO DE OCONGATE,  
QUISPICANCHI-CUSCO.....

Presentado por: .....LISBET BUSTAMANTE FLORES..... DNI N° .....47238296.....;  
presentado por: .....MARIA TERESA QUISPE JANAHUARI..... DNI N°: .....70115503.....  
Para optar el título Profesional/Grado Académico de .....BIÓLOGO.....

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por .....02..... veces, mediante el  
Software de Similitud, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso del Sistema Detección de  
Similitud en la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de .....4.....%.

### Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

| Porcentaje     | Evaluación y Acciones   | Marque con una (X) |
|----------------|---|--------------------|
| Del 1 al 10%   | No sobrepasa el porcentaje aceptado de similitud.   | X                  |
| Del 11 al 30 % | Devolver al usuario para las subsanaciones.   |                    |
| Mayor a 31%    | El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, conforme al reglamento, quien a su vez eleva el informe al Vicerrectorado de Investigación para que tome las acciones correspondientes; Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley. |                    |

Por tanto, en mi condición de Asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto**  
las primeras páginas del reporte del Sistema de Detección de Similitud.

Cusco, .....02..... de .....DICIEMBRE..... de 20.....25.....

.....ELENA EMPERATRIZ MADERA TUPAYACHI.....  
Firma

Post firma.....ELENA EMPERATRIZ MADERA TUPAYACHI.....

Nro. de DNI.....23830621.....

ORCID del Asesor.....0000-0002-5349-461X.....

### Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema de Detección de Similitud: oid: .....27259°535313746.....

# BUSTAMANTE FLORES QUISPE JANAHUIRI

## EFFECTO BACTERICIDA EN *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 DE ESPECIES DE *Lactobac...*



Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

### Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:535313746

132 páginas

Fecha de entrega

2 dic 2025, 11:37 a.m. GMT-5

23.867 palabras

137.517 caracteres

Fecha de descarga

2 dic 2025, 12:42 p.m. GMT-5

Nombre del archivo

EFFECTO BACTERICIDA EN *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 DE ES....pdf

Tamaño del archivo

3.8 MB

## 4% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...




### Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 8 palabras)
- Base de datos de Crossref
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

### Exclusiones



- N.º de coincidencias excluidas

### Fuentes principales

- 4%  Fuentes de Internet
- 0%  Publicaciones
- 2%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

### Marcas de integridad

#### N.º de alertas de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**  
78 caracteres sospechosos en N.º de páginas  
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.
-  **Texto oculto**  
58 caracteres sospechosos en N.º de páginas  
El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Valentina y Julio por inculcarme valores y principios y ser mi motivación para seguir adelante, los quiero mucho.

A mis hermanos por su apoyo incondicional e impulsar mi vida profesional.

A todas las personas cercanas, amigos, compañeros y círculo social, quienes siempre me inspiraron y animaron para alcanzar mis objetivos.

**Lisbet Bustamante Flores**

A mi mamá, Amalia, a mi papá y hermanos quienes siempre han sido mi mayor apoyo y motivación en cada etapa de mi vida, les dedico este trabajo. Gracias por creer en mí y por ser mi fuente de inspiración.

A compañeros de laboratorio y todas las personas que me brindaron su apoyo en cada paso.

A todos ustedes, les dedico esta tesis con todo mi cariño y gratitud, porque sin ustedes no habría sido posible llegar hasta aquí.

**Maria Teresa Quispe Janahuri**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por guiar nuestras vidas y darnos el impulso para luchar día a día sin caer ni rendirnos ante las adversidades y darnos la oportunidad de vivir plenamente en Él.

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco por habernos brindado una casa de estudios. A la Facultad de Ciencias Biológicas, por darnos los conocimientos necesarios y poder formarnos profesionalmente.

A nuestra asesora Blga. Elena Emperatriz Madera Tupayachi por compartir con nosotras sus enseñanzas, paciencia, amabilidad y cariño en cada momento de la realización de esta investigación. Gracias por todo.

A la Dra. Heldy Y. Espinoza Carrasco por su apoyo y sus consejos.

A la Blga. Olga L. Cjuno Huanca por su confianza y tiempo compartido con nosotras.

A nuestros amigos y personas más cercanas por darnos ánimos y palabras de aliento en momentos difíciles, sacarnos sonrisas y alentarnos a continuar. Los tenemos presentes siempre.

A todos aquellos que no mencionamos, pero saben que han sido una pieza clave para la culminación de este trabajo de investigación. Les agradecemos de todo corazón.

## ÍNDICE

|  |      |
|--|------|
| RESUMEN .....  | III  |
| INTRODUCCIÓN .....   | IV   |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....   | VI   |
| JUSTIFICACIÓN .....  | VIII |
| OBJETIVOS .....  | X    |
| HIPÓTESIS.....   | XI   |
| CAPITULO I .....   | 1    |
| 1.1. ANTECEDENTES.....   | 1    |
| 1.1.1. Internacionales .....   | 1    |
| 1.1.2. Nacionales .....  | 8    |
| 1.1.3. Locales .....   | 11   |
| 1.2. Generalidades .....   | 12   |
| 1.2.1. Lactobacillus.....  | 12   |
| 1.2.1.1. <i>Posición Taxonómica.</i> .....                                 | 13   |
| 1.2.2. Bacteriocinas .....   | 15   |
| 1.2.2.1. <i>Características Generales.</i> .....                           | 15   |
| 1.2.2.2. <i>Clasificación de las bacteriocinas</i> .....                   | 17   |
| 1.2.2.3. <i>Mecanismo de acción.</i> .....                                 | 18   |
| 1.2.2.4. <i>Bacteriocinas representativas.</i> .....                       | 21   |
| 1.2.2.5. <i>Rango de Acción de las Bacteriocinas</i> .....                 | 23   |
| 1.2.2.6. <i>Factores que afectan la eficacia de la bacteriocina.</i> ..... | 24   |
| 1.2.3. Quesos .....  | 25   |
| 1.2.3.1. <i>Tipos de quesos</i> .....                                      | 26   |
| 1.2.3.2. <i>Proceso de elaboración del queso.</i> .....                    | 27   |
| 1.2.4. Cuajo.....  | 30   |
| 1.2.4.1. <i>Características</i> .....                                      | 30   |
| 1.2.4.2. <i>Abomaso adulto</i> .....                                       | 31   |
| 1.2.4.3. <i>Componentes enzimáticos del abomaso</i> .....                  | 31   |
| 1.2.4.4. <i>Preparación del Cuajo de Alpaca.</i> .....                     | 32   |
| 1.2.5. Cepas ATCC .....  | 32   |

|   |    |
|---|----|
| 1.2.5.1. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 .....   | 32 |
| 1.2.5.2. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 .....  | 33 |
| CAPITULO II .....   | 34 |
| 2.1. ÁREA DE ESTUDIO .....  | 34 |
| 2.2. MATERIALES .....   | 36 |
| 2.2.1. Muestra.....   | 36 |
| 2.2.2 MATERIAL BIOLÓGICO .....  | 36 |
| 2.2.3 MATERIALES DE LABORATORIO .....   | 36 |
| 2.2.4. MATERIALES DE CAMPO Y OTROS.....   | 38 |
| 2.3. METODOLOGÍA .....  | 39 |
| 2.3.1. Tipo de Investigación.....   | 39 |
| 2.3.2. Flujograma de la Metodología de Investigación.....   | 40 |
| 2.3.3. Muestreo.....  | 41 |
| 2.3.4. Criterios de Selección de la Muestra.....  | 41 |
| 2.3.5. Toma de Muestra.....   | 41 |
| 2.4. CUANTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE <i>Lactobacillus sp.</i> DE QUESOS ARTESANALES.....   | 42 |
| 2.4.1. Cuantificación de BAL .....  | 42 |
| 2.4.2. Aislamiento de BAL .....   | 42 |
| 2.4.3. Selección de <i>Lactobacillus sp.</i> .....  | 43 |
| 2.4.4. Conservación de <i>Lactobacillus sp.</i> .....   | 43 |
| 2.5. DETERMINACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DE <i>Lactobacillus sp.</i> FRENTE A <i>E. coli</i> ATCC 25922 Y <i>S. aureus</i> ATCC 25923 .....                                      | 43 |
| 2.5.1. Activación de Cepas ATCC <i>E. coli</i> 25922 y <i>S. aureus</i> 25923 y Preparación de Escala de Mcfarland 0,5 .....  | 44 |
| 2.5.2. Selección de cepas con efecto bactericida, por el método de picada (Zamora, 2003) y Formación de Halos de Inhibición.....  | 44 |
| 2.5.3 Identificación Bioquímica de <i>Lactobacillus sp.</i> .....   | 45 |
| 2.5.4 Efecto Bactericida de las especies <i>Lactobacillus sp.</i> por el Método De Kirby Bauer Modificada Frente a Cepas ATCC <i>E. coli</i> 25922 y <i>S. aureus</i> 25923 ..... | 45 |
| 2.5.5 Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus sp.</i> con mayor efecto bactericida .....  | 46 |
| 2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....   | 46 |
| CAPITULO III.....   | 47 |



|   |    |
|---|----|
| 3.1. MUESTREO DE QUESOS ARTESANALES .....   | 47 |
| 3.2. CUANTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE <i>Lactobacillus sp.</i> A<br>PARTIR DE QUESOS ARTESANALES .....                                | 48 |
| 3.2.1. Cuantificación de BAL .....  | 48 |
| 3.2.2. Aislamiento de BAL .....   | 53 |
| 3.2.3. Selección de <i>Lactobacillus sp.</i> .....  | 55 |
| 3.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DE <i>Lactobacillus sp.</i> FRENTE A<br><i>E. coli</i> ATCC 25922 y <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ..... | 57 |
| 3.3.1 Selección de Cepas con Efecto Bactericida, por el Método de Picada (Zamora,<br>2003) .....  | 57 |
| 3.3.2 Identificación Bioquímica de cepas de <i>Lactobacillus sp.</i> .....  | 59 |
| 3.3.3 Efecto bactericida por el método de Kirby Bauer modificada frente a <i>E. coli</i> ATCC<br>25922 y <i>S. aureus</i> ATCC 25923 .....      | 65 |
| 3.3.4. Caracterización de <i>Lactobacillus sp.</i> con mayor Efecto Bactericida .....   | 76 |
| CONCLUSIONES .....  | 79 |
| RECOMENDACIONES .....   | 80 |
| BIBLIOGRAFÍA .....  | 81 |

## INDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1 <i>Características generales de las bacteriocinas</i> .....  | 16 |
| Tabla 2 <i>Clasificación de bacteriocinas</i> .....  | 18 |
| Tabla 3 <i>Tipos de bacteriocinas y microorganismo productor</i> .....   | 24 |
| Tabla 4 <i>Procedencia del queso artesanal muestreado</i> .....  | 47 |
| Tabla 5 <i>Promedios del recuento de BAL y tipo de cuajo usado en los quesos artesanales</i> .....   | 48 |
| Tabla 6 <i>Recuento en UFC/gr por tipo de cuajo/ANOVA</i> .....  | 50 |
| Tabla 7 <i>Promedios de las UFC/gr de 10<sup>9</sup> por lugar de procedencia /ANOVA</i> .....   | 51 |
| Tabla 8 <i>Número de colonias BAL aisladas, por lugar de procedencia</i> .....   | 53 |
| Tabla 9 <i>Número de cepas de Lactobacillus sp. aislados</i> .....   | 56 |
| Tabla 10 <i>Halos de inhibición de Lactobacillus sp. frente a E.coli ATCC 25922 y S.aureus ATCC 25923</i> .....                                    | 57 |
| Tabla 11 <i>Identificación bioquímica de Lactobacillus sp.</i> .....   | 60 |
| Tabla 12 <i>Proporciones de identificación bioquímica de especies de Lactobacillus sp.</i> .....   | 61 |
| Tabla 13 <i>Otras pruebas adicionales para la identificación</i> . .....   | 62 |
| Tabla 14 <i>Porcentaje de especies de Lactobacillus sp. identificados por pruebas bioquímicas</i> ...62  |    |
| Tabla 15 <i>Halos de inhibición de Lactobacillus ya identificados, frente a E.coli ATCC 25922 y S.aureus ATCC 25923</i> .....                      | 66 |
| Tabla 16 <i>ANOVA y prueba Tukey para el diámetro de los halos de inhibición generados por Lactobacillus sp. frente a E. coli ATCC 25922</i> ..... | 68 |
| Tabla 17 <i>ANOVA y prueba Tukey para el diámetro de los halos generados por Lactobacillus sp. frente a S.aureus ATCC 25923</i> .....              | 71 |
| Tabla 18 <i>Efecto bactericida del Lactobacillus sp. frente a E. coli</i> .....  | 74 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabla 19 <i>Efecto bactericida del Lactobacillus sp. frente a S. aureus</i> .....   | 75  |
| Tabla 20 <i>Datos de absorbancias y tiempos</i> .....   | 76  |
| Tabla 21 <i>Número de colonias de BAL por queso y procedencia con características fenotípicas, catalasa, oxidasa y coloración Gram.</i> ..... | 101 |
| Tabla 22 <i>Porcentaje de microorganismos aislados</i> .....  | 105 |

## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 <i>Representación gráfica del mecanismo de acción dual de la nisin</i> .....   | 20 |
| Figura 2 <i>Representación gráfica del mecanismo de acción dual de la nisin</i> .....   | 20 |
| Figura 3 <i>Diagrama general del proceso de elaboración de queso fresco</i> .....   | 28 |
| Figura 4 <i>Formación del coágulo de caseína</i> .....  | 29 |
| Figura 5 <i>Mapa de ubicación del Mercado Ferial de Ocongate</i> .....  | 35 |
| Figura 6 <i>Flujograma de la metodología de investigación</i> .....   | 40 |
| Figura 7 <i>Porcentaje de muestreo de quesos artesanales provenientes de tres comunidades del distrito de Ocongate.</i> .....       | 47 |
| Figura 8 <i>Promedio del recuento de microorganismos ácido lácticos en UFC/gr</i> .....   | 49 |
| Figura 9 <i>Recuento de BAL en UFC/gr por tipo de cuajo</i> .....   | 50 |
| Figura 10 <i>Recuento de BAL en UFC/gr por procedencia</i> .....  | 52 |
| Figura 11 <i>Porcentaje del número de colonias aisladas de BAL por su procedencia.</i> .....  | 54 |
| Figura 12 <i>Porcentaje de microorganismos hallados</i> .....   | 55 |
| Figura 13 <i>Diámetro del halo generado por las cepas de Lactobacillus sp. sobre Escherichia coli y Staphylococcus aureus</i> ..... | 58 |
| Figura 14 <i>Cepas cultivadas por el método de picada y producción de halos</i> .....   | 58 |
| Figura 15 <i>Porcentaje de especies identificadas de Lactobacillus sp</i> .....   | 63 |
| Figura 16 <i>Promedio de diámetros de los halos de inhibición generados, frente a E. coli ATCC 25922</i> .....                      | 67 |
| Figura 17 <i>Promedio de las medidas de los diámetros de los halos generados frente a S. aureus ATCC 25923</i> .....                | 67 |
| Figura 18 <i>Halo generado por tratamiento de Lactobacillus sp. frente a E. coli</i> .....  | 70 |
| Figura 19 <i>Halo generado por tratamiento de Lactobacillus sp. contra S. aureus</i> .....  | 73 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 20 Efecto bactericida del <i>Lactobacillus</i> sp. frente a <i>E. coli</i> .....        | 74 |
| Figura 21 <i>Efecto bactericida del Lactobacillus sp. frente a Staphylococcus aureus</i> ..... | 75 |
| Figura 22 <i>Curva de crecimiento de L. plantarum</i> .....                                    | 76 |
| Figura 23 <i>Curva de crecimiento de L. fermentum</i> .....                                    | 77 |
| Figura 24 <i>Curva de crecimiento de L. brevis</i> .....                                       | 77 |
| Figura 25 <i>Curva de crecimiento de L. helveticus</i> .....                                   | 78 |

## RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo de investigación fue determinar el efecto bactericida de *Lactobacillus sp.* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, para lo cual se muestreó 30 quesos frescos artesanales del mercado ferial del Distrito de Ocongate, Quispicanchi-Cusco entre los meses de enero a marzo del 2022, tomando en cuenta su procedencia y tipo de cuajo utilizado en su preparación, se aisló bacterias ácido lácticas por el método de diluciones seriadas y selección de *Lactobacillus sp.* por coloración Gram, catalasa y oxidasa obteniendo 17 cepas que fueron identificadas, obteniendo así 4 especies: *Lactobacillus fermentum* (53%), *Lactobacillus brevis* (29%), *Lactobacillus plantarum* (12%) y *Lactobacillus helveticus* (6%). Luego se hizo uso de la metodología de Kirby Bauer modificada, con la finalidad de conocer su efecto bactericida, teniendo como resultado que *Lactobacillus sp.* sí tuvo efecto bactericida frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Siendo *Lactobacillus helveticus* una de las especies con mayor efecto sobre *Escherichia coli* y *Lactobacillus plantarum* frente a *Staphylococcus aureus*.

**Palabras clave:** *Lactobacillus sp.*, Efecto bactericida, Queso fresco artesanal, Kirby Bauer.

## INTRODUCCIÓN

El queso es un elemento fundamental en la economía de la sociedad, por ejemplo, en las comunidades andinas del distrito de Ocongate en Cusco, su actividad socioeconómica está centrada en la agricultura y ganadería tradicional, teniendo como actividad complementaria la elaboración de quesos artesanales (Loayza, 2019). Los quesos son productos fermentados que poseen una gran variedad de moléculas beneficiosas para la salud como el ácido aminobutírico, feniletilamina, péptidos bioactivos y vitaminas del complejo B como la B12, las cuales son sintetizadas por las Bacterias ácido lácticas (Pessione, 2012).

Las bacterias ácido lácticas (BAL), desempeñan un papel importante en la elaboración de los quesos por estar vinculados en el proceso de fermentación y maduración (Martínez et al., 2016). Generalmente son conocidas por la abreviatura BAL, estas se encuentran dentro del Filum *Firmicutes* y Orden *Lactobacillales* que está compuesto por seis familias, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae* (Sauer et al., 2017). Actualmente son utilizadas en forma de cultivos iniciadores; el desarrollo de la industria de transformación, particularmente en la industria láctea, ha llevado a la producción de fermentos industriales o cultivos iniciadores para la elaboración de leches fermentadas, cremas, mantequillas y quesos; también en productos cárnicos y bebidas alcohólicas (Cobo et al., 2019). *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* son los géneros más utilizados para este fin, estos organismos han sido aislados de diferentes sustratos neutros como entornos de origen animal y sustratos ácidos típicos de alimentos de origen vegetal, incluso han sido aisladas de ambientes con condiciones extremas de altas temperaturas y altas concentraciones de sal (Agudelo et al., 2015).

Las bacterias ácido-lácticas llevan a cabo su actividad antimicrobiana mediante la producción de ácidos orgánicos que les permite influir en el pH del medio, limitando así el crecimiento de otros microorganismos (Cobo et al., 2019). No obstante, su acción bactericida no solo se limita a la acidificación, sino también a compuestos como el peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas, que tienen un efecto beneficioso en la conservación de alimentos, terapias médicas incluso actúan como alternativas a antibióticos tradicionales (Radaic et al., 2020).

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana, por ello representan un sustituto potencial de conservantes químicos, son segregadas por un gran número de BAL, a las cuales son consideradas seguras, estos péptidos son importantes en la preservación y fermentación de alimentos, el uso de bacteriocinas como biopreservantes se atribuye a sus características como de inhibir numerosos microorganismos, su acción en amplios rangos de pHs y termoestabilidad (Mondragón, et al., 2013).

Las bacteriocinas, actúan sobre la membrana citoplasmática donde las proteínas se unen a los fosfolípidos de las células susceptibles, siendo su naturaleza anfipática una característica que facilita su distribución en la membrana, permitiendo así su actividad antimicrobiana (Cotter et al., 2005, como se citó en Yusuf, 2013).

El presente trabajo de investigación se efectuó en la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias Biológicas en el Laboratorio de Biología Celular, donde se determinó el efecto bactericida en *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de especies de *Lactobacillus* aislados de quesos artesanales del mercado ferial del distrito de Ocongate, Quispicanchi-Cusco.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El queso fresco artesanal, es un producto lácteo elaborado rico en nutrientes esenciales como calcio, proteínas y vitaminas A, B12, D y E, que varía según la variedad y es una excelente opción para incluirlos en la dieta, ya que contribuyen al desarrollo de huesos y dientes (Datsa, 2017). Pero debido a la falta de acceso a tecnología moderna y el procesamiento de la leche y la producción de quesos frescos en condiciones higiénicas deficientes, hace que estos manifiesten un mayor recuento de microorganismos patógenos al momento de ser comercializados, por esta razón se le asocia con mayor frecuencia a brotes de intoxicaciones alimentarias (Condo, 2016), siendo un claro ejemplo los datos informados por el Sistema de Información Regional Para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos, del Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ), que indica que entre los años 1993 y 2001 en el Perú hubieron 12 brotes de enfermedades producidas por el consumo de productos lácteos, que representa el 11.5% del total de casos de enfermedades transmitidas por alimentos en esos años, brotes que afectaron a 1278 personas, de los cuales 24 fallecieron (Cristóbal & Mautua, 2003, como se citó en Molleda, 2016).

Las intoxicaciones alimentarias, conocidas también como toxiinfecciones alimentarias, son enfermedades que se transmiten a través de los alimentos contaminados con microorganismos patógenos o las toxinas que estos liberan (CECU, 2001). Estos microorganismos patógenos son adquiridos a través de la leche utilizada, por ejemplo *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, especialmente si se utiliza leche cruda, comúnmente *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Clostridium botulinum* han sido los patógenos más inquietantes en la industria alimentaria. Sin embargo, en los últimos años, otros microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus*

*cereus* y *Escherichia coli* verotoxigénico han ganado importancia como causantes de las toxiinfecciones alimentarias (López & Domingo, 2007; Wilkinson, 2007).

La industria alimentaria, específicamente de la producción de queso enfrenta un desafío creciente en cuanto a la seguridad alimentaria (Favaro et al., 2015), pues las nuevas tendencias del mercado exigen productos saludables, libres de microorganismos patógenos y con cualidades sensoriales atractivas para los consumidores (FAO, 2003). En consecuencia, hoy en día se están buscando alternativas naturales para alargar la vida útil de los alimentos, sumado al hecho de la continua existencia de disminuir y prohibir cada vez más el uso de preservantes, conservantes y aditivos químicos en los mismos, debido a los efectos adversos que puede causar en la salud del consumidor, obligando a la búsqueda de alternativas para poder conservarlos (Peralta, 2014). Entre una de las opciones que se tiene, podemos mencionar a las bacteriocinas, que son sustancias de naturaleza peptídica, sintetizadas por organismos probióticos como los lactobacilos, que se encuentran en el tracto gastrointestinal, mucosas y alimentos como productos lácteos como la leche y el queso (Mondragón et al., 2013).

El queso fresco de elaboración artesanal, al no pasar por un proceso de maduración prolongado como sucede en el caso de un queso comercial, posee una fuente natural de bacterias ácido lácticas provenientes de la biota microbiana natural presente en la leche cruda utilizada como materia prima y en la microbiota gastrointestinal de animales (Pérez et al., 2015), otorgando características sensoriales que gozan de una alta aceptación entre la población (Mago et al., 2015).

Por lo mencionado anteriormente se propone la siguiente interrogante de investigación: ¿Cuál será el efecto bactericida en *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de especies de *Lactobacillus* aislados de quesos artesanales del mercado ferial del distrito de Ocongate, Quispicanchi-Cusco?

## JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas se han desarrollado productos innovadores como los alimentos “saludables o funcionales”, refiriéndose a aquellos con características nutricionales y beneficios fisiológicos adicionales para el mejoramiento de la calidad de vida (Fuentes et al., 2015).

Es así que aunque los conservantes químicos son efectivos, muchas personas los rechazan debido a probables efectos secundarios (Agudelo, 2023). En consecuencia hay un fuerte interés actual de desarrollar tecnologías enfocadas al mantenimiento y conservación de una gran variedad de productos alimenticios y lácteos de forma natural, con el propósito de potenciar su aroma, sabor y textura, además de inhibir la proliferación de microorganismos patógenos (Gandolfo, 2021).

El queso es un ejemplo claro, ya que, al ser un producto lácteo ampliamente consumido a nivel global debido a su naturaleza perecedera, puede convertirse en una fuente de transmisión de enfermedades si no se maneja adecuadamente. La mala manipulación, el transporte inadecuado y las temperaturas de almacenamiento incorrectas pueden comprometer la seguridad del producto, permitiendo la contaminación bacteriana por patógenos como: *Staphylococcus aureus* que puede tener graves consecuencias para la salud, especialmente en personas vulnerables, inmunocomprometidos y hospitalizados (Vasquez et al., 2012), y por otra parte por bacterias coliformes que comprende a *Escherichia coli* y a otros géneros de la familia Enterobacteriaceae como *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*. Siendo *Escherichia coli* un indicador clave de contaminación directa o indirecta de origen fecal en alimentos y agua, ya que habitualmente se encuentra en el intestino de humanos y animales de sangre caliente, y advierte sobre la potencial presencia de patógenos entéricos en diversos productos alimenticios (Baylis et al., 2011), causando síntomas como calambres estomacales agudos, diarrea con sangre y náuseas, fiebre, etc. Además, puede provocar daños permanentes en riñones, siendo más peligroso en niños (Gimferrer, 2014).

Por esto, la industria alimentaria actualmente promueve el uso de metabolitos producidos por las BAL, como las bacteriocinas, que son péptidos antimicrobianos caracterizados por su bajo peso molecular, termoestabilidad, sensibilidad a proteasas y ser estables a pH bajos, propiedades que las convierten en alternativas para reducir el uso de agentes químicos en alimentos (Fuentes et al., 2017), además de otras sustancias antimicrobianas como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, entre otros (Gandolfo, 2021). Su síntesis está vinculada a la fase exponencial de la cepa y generalmente se detiene al final del crecimiento, esto puede deberse a la adsorción celular o su degradación por enzimas proteolíticas (Alquicira, 2006), sobre todo el género *Lactobacillus* que tienen un mayor efecto inhibitorio sobre bacterias Gram Negativas, actuando así de esta manera como sustituto de aditivos químicos (Vásquez et al., 2009).

Por ello la importancia de conocer el efecto bactericida en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de especies de *Lactobacillus* aislados de quesos artesanales. Ya que estos pueden contribuir en la formación de compuestos nitrogenados como las aminas biógenas que normalmente están presentes en bajas concentraciones en la mayoría de los alimentos con alto contenido en proteínas como los quesos, que pueden causar intoxicaciones, a veces graves, cuando estas se encuentran en altas concentraciones (Cristóbal & Maurtua, 2003).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto bactericida en *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de especies de *Lactobacillus* aislados de quesos artesanales del mercado ferial del distrito de Ocongate, Quispicanchi-Cusco.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Aislar e identificar por fenotipificación, las cepas de *Lactobacillus sp.* provenientes de quesos artesanales.
2. Determinar el efecto bactericida de *Lactobacillus sp.* aislados, frente a *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC25923 mediante la técnica de Kirby-Bauer modificada.
3. Determinar la cinética de crecimiento de las especies de *Lactobacillus* con mayor efecto bactericida.

## HIPÓTESIS

“Las especies de *Lactobacillus* aislados de quesos artesanales del mercado ferial del distrito de Ocongate, Quispicanchi-Cusco, tienen efecto bactericida en *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923”

## CAPITULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1. ANTECEDENTES

##### 1.1.1. Internacionales

**Carol et al. (2021).** Investigó el potencial tecnológico de Bacterias lácticas (BAL) presentes en quesos de cabra de la ciudad de Santiago del Estero en Argentina, logrando aislar 50 cepas de BAL, de las cuales 14 fueron seleccionadas para evaluar sus propiedades tecnológicas y funcionales, estas cepas seleccionadas mostraron en su totalidad, crecimiento, acidificación de la leche con producción de ácido láctico, actividad proteolítica siendo la concentración de aminoácidos de 0.05 a 6.08 mg/ml en 24 horas. Además, al someter a las cepas a estrés ácido con pH igual a 2.5, estas demostraron Resistencia con una tasa de supervivencia superior al 93%, no siendo de la misma forma al someterlos a ácido deóxicólico, donde solo 3 cepas presentaron una supervivencia del 70%. Por último, 3 cepas mostraron capacidad para inhibir el crecimiento de una cepa patógena de *E. coli*. Estos hallazgos sugieren que las BAL podrían ser utilizadas como probióticos en los productos lácteos.

**Wong et al., (2021).** Aisló bacterias ácido lácticas de 72 muestras de queso crema artesanal de la región de Chiapas, en México, y se llevaron para su procesamiento a la Universidad Tecnológica de la Selva, División Agroalimentaria, donde se cultivaron en medio de cultivo MRS, obteniendo un total de 216 colonias características de BAL, y se evaluó su capacidad bactericida por el método de botón contra cepas patógenas como *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Salmonella entérica* var. *Typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella flexnerii* ATCC

12022 y *Staphylococcus aureus* ATC 25923. Se identificó 82 cepas de *Lactobacillus* mediante pruebas bioquímicas y análisis genético, demostrando que cuando estos se añadían a la elaboración del queso se reducía o eliminaba los microorganismos indeseables como *Staphylococcus aureus* y levaduras, a diferencia del queso elaborado con leche pasteurizada donde se detectó 290 UFC/mL de mohos y levaduras. Los resultados sugieren que las cepas aisladas tienen gran potencial como cultivo iniciador para mejorar la seguridad y conservación del queso crema y productos similares.

**Fuentes et al. (2017).** Evaluó la capacidad antimicrobiana de 32 aislados de BAL autóctonas aisladas de queso doble Crema y Quesillo producidos en los municipios del Valle de Ubaté y Bajo Magdalena, Colombia, y caracterizados molecularmente mediante el análisis de secuencias del gen 16S ADNr en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, entre los cuales se hallaron las especies de *Leuconostoc sp*, *Lactococcus lactis* QDC18, QDC23, QDC30 y *Lactobacillus fermentum* QDC32, sometidos a microorganismos como *Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Tiphymurium* ATCC 13311 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 mediante la técnica de mancha en agar, interpretando como positivo zonas de inhibición con halos mayor a 2 mm, procedimiento que realizó por triplicado. Así mismo se evaluó su capacidad acidificante, proteolítica y lipolítica para valorar su potencial en la preparación de un cultivo iniciador nativo, obteniendo como resultado que QDC23, QDC18 Y QDC32, tuvieron buena capacidad acidificante y proteolítica, QDC18, QDC23, QDC30 y QDC32 presentaron actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, que indican importancia en el desarrollo del sabor en los procesos de maduración. Luego de este proceso, se aisló los sobrenadantes libres de células y se evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en gel por perforación en placa, de los cuales *Lactococcus lactis subsp. lactis* Q5, presento actividad de 64.000 UA/ mL frente a *L. monocytogenes* y 4.000 UA/mL para *S. typhimurium*. Llegando a la



conclusión que las BAL de estos quesos poseen potencial bactericida y que si pueden ser usados en la elaboración de un cultivo iniciador con efecto bioprotector.

**Calle (2016).** En su investigación, aisló y caracterizó BAL del suero de quesos obtenidos en diferentes queserías de la Provincia de Cañar y procesados en la Universidad del Azuay en la ciudad de Cuenca en Ecuador, con el objetivo de evaluar su capacidad antibacterial, las muestras se cultivaron en agar MRS Y M17, y se identificaron dos cepas, *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* y *Lactobacillus plantarum*, mediante pruebas bioquímicas. Posteriormente evaluó la actividad antibacteriana de las cepas identificadas frente a cepas patógenas como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enteritis* ATCC 13076 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 mediante pruebas de difusión en agar, obteniendo como resultado que *L. paracasei* es eficaz frente a bacterias Gram positivas y negativas, mientras que *L. plantarum* es efectiva contra bacterias Gram negativas. Finalmente, las cepas aisladas fueron crioconservadas para futuros estudios.

**Novillo (2016).** Aisló e identificó bacterias ácido lácticas nativas de quesos artesanales del cantón San Fernando, trabajo efectuado en la Universidad del Azuay en Ecuador, identificando tres especies, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis* y *Leuconostoc lactis* por medio del sistema de identificación API CH 50 y evaluó su capacidad de combatir patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritis*, obteniendo como resultado halos mayores a 5 mm, lo que indicó un resultado antibacteriano activo.

**Aparicio (2016).** Aisló de 11 diferentes tipos de queso, obtenidos de pequeños y grandes comercios, colonias de BAL. Investigación efectuada en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén – España, utilizando el método de diluciones seriadas y cultivando en agar MRS, y someterlas a 3 tipos de ensayo para evaluar su actividad antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis* S-47 y *Listeria innocua* 4030. Obtuvo como resultado la presencia de

Bacilos Gram positivos en la totalidad de cepas aisladas a excepción de dos cepas Gram negativas, las cuales fueron aisladas de Queso Semicurado de oveja y Queso fresco. Al menos una cepa de cada queso presentó actividad antimicrobiana frente a las dos cepas patógenas en el ensayo en cruz. En el ensayo en gota, todas las cepas presentaron halos frente a los dos patógenos, a excepción de las cepas del queso de cabra que solo presentó actividad antimicrobiana frente a *L. innocua* y una cepa del queso Enmental que no presentó actividad frente a ninguno de los dos patógenos. En el ensayo en pocillo se obtuvieron resultados similares, de diámetros de 10 mm en todas las cepas, las cepas del queso Havarti solo presentaron actividad frente a *L. innocua*. Llego a la conclusión de que los quesos con mayor actividad antimicrobiana eran el Semicurado Mezcla, Gorgonzola, Enmental y Tierno mezcla (oveja), el ensayo en cruz resulto más efectivo, y se obtuvo mayores diámetros con el ensayo en gota.

**Ramírez & Vélez (2016).** Aislaron y caracterizaron 18 cepas autóctonas de leche cruda y queso fresco artesanal de cabra muestreados del Rancho El Sahuaro, Tecamachalco, Puebla, México, y llevados al laboratorio del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de las Américas, Puebla. Organizaron su estudio en tres partes, siendo la primera la evaluación de sus características funcionales, donde pudieron distinguir las cepas homolácticas de las heterolácticas, presencia de actividad proteolítica de más del 60% de los aislados, actividad lipolítica por 3 cepas y baja producción de gas. En la segunda etapa identificaron los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* mediante el sistema API 50 CH, siendo *Lactobacillus* el género predominante en ambas muestras de leche cruda y queso artesanal con una presencia del 56 %, las especies caracterizadas fueron *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis* y *Leuconostoc mesenteroides*. Finalmente, en la tercera parte del estudio se realizó pruebas de antagonismo cruzado y cinética de crecimiento en leche, que permitió

conocer la compatibilidad entre cepas para la formulación de cultivos mixtos y deducir la eficiencia de las cepas lácticas para mejorar la calidad microbiológica de un producto lácteo.

**Durán et al. (2010).** Evaluaron la calidad higiénico-sanitaria de 16 muestras de queso de capa adquiridos de cuatro sitios de fabricación artesanal del municipio de Mompóx-Bolivar, Colombia, y llevados al laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de Cartagena, obteniendo como resultado altos niveles de contaminación microbiana con presencia de *Escherichia coli* y ausencia de *Salmonella sp.* por medio del método del número más probable (NMP). Además, se aisló *Lactobacillus* y *Lactococcus*, del queso y *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* de yogurt comercial para evaluar la capacidad antagónica, mediante el ensayo de difusión en pozos con modificaciones utilizando 10 a 100  $\mu$ L del extracto obtenido de la homogenización de 5 gr de queso y enfrentados *E.coli* ATCC 25922, y en el caso de los Lactobacilos aislados del yogurt se enfrentó a 15  $\mu$ L de *E. coli* aislados del queso. Se obtuvo como resultado que las bacteriocinas activas del queso fueron negativas, mientras que los *Lactobacillus* aislados del yogurt inhibieron el crecimiento de *E. coli* presentando en promedio halos de 7,2 mm, hecho considerado como actividad antagónica positiva, que podría deberse a la producción de ácidos orgánicos, compuestos carboxílicos y bacteriocinas.

**Ramirez (2010).** Aisló *Lactobacillus sp.* y evaluó su capacidad antagónica in vitro de queso doble crema, queso tipo paipa, kumis y yogurt, elaborados artesanalmente, obtenidos de la región Cundiboyacence, Colombia, y llevados al laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana para su proceso. El aislamiento se hizo por medio de siembra en agar MRS, y la identificación bioquímica se efectuó por pruebas de azúcares fermentables mediante la técnica de microplaca. Así mismo, se realizó pruebas de catalasa, oxidasa y adaptabilidad a diferentes concentraciones de NaCl por el método ecométrico. El potencial

antagónico se evaluó mediante el ensayo de Ritter enfrentando los *Lactobacillus sp.* a las cepas aisladas a *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Penicillium sp.* y *Aspergillus niger*, los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas, lo que sugirió que los bacilos aislados de los productos lácteos no presentaron actividad bactericida, así mismo se evaluó la producción de metabolitos extracelulares que también presentaron diferencia estadísticamente significativas, intuyendo así que no hubo producción de bacteriocinas, en cambio las levaduras aisladas si presentaron un bajo poder inhibitorio contra *E. coli*. Por lo que el autor recomienda que la prueba de antagonismo se realice en medios que permitan el buen desarrollo de las cepas enfrentadas como BHI y MRS.

**Martín del Campo et al. (2008).** Obtuvieron bacterias ácido lácticas con capacidad bacteriocinogénicas de quesos frescos conseguidos de la zona metropolitana de Guadalajara, México y determinaron la acción antagónica frente a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β hemolítico* del Grupo A y *Salmonella agona*, cultivando las muestras mediante diluciones en serie y la técnica de inoculación en superficie en medio APN normal realizando luego el recuento de UFC, aislando un total de 350 cepas las cuales se sometieron a pruebas de identificación tales como Gram, catalasa y movilidad. Posteriormente se determinó la actividad antagónica de las BAL con la técnica de inoculación por picadura en medio APN mb previamente inoculado con los microorganismos patógenos conservando aquellas cepas que produjeron halos con diámetros mayor a 1 mm y exponiéndolos a diferentes parámetros para definir los mecanismos antagónicos, llegando a la conclusión que de 350 cepas solo 25 mostraron capacidad antagónica frente a alguno de los patógenos antes mencionados, siendo *Listeria monocytogenes* la que mostró mayor sensibilidad y que al reducir el pH se refleja un mayor efecto

bactericida debido a ácidos orgánicos, así como también al exponer los sobrenadantes a enzimas proteolíticas se demostró que el efecto inhibidor es de naturaleza proteica.

**Zamora (2003).** Aisló, identificó y conservó cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero, de 4 industrias de Comarcas, utilizando muestras de sangre con anticoagulante citrato sódico tomados al momento de los sacrificios de los cerdos y llevados al Departamento de Ingeniería Química, Agraria y Tecnología alimentaria de la Universidad de Girona. Utilizó la técnica de diluciones seriadas y siembra por profundidad en agar MRS, tinción Gram y prueba de catalasa, llegando a aislar 112 cepas de BAL a partir de 62 muestras y determinó su capacidad antagónica por medio de siembra por picada en agar MRS % para 12 con una sobre capa de agar nutritivo blando donde se encontraban suspendidos cepas indicadoras de colección como *Escherichia coli* NCTC5934, *Staphylococcus aureus* NCTC 4163, *Pseudomonas fluorescens* EP537 y *Bacillus subtilis* MERCK (BGA), y cepas aisladas de sangre de matadero como *E. coli*, *S. aureus*, *P. fluorescens*, y *Bacillus*, consideró como positivas aquellas que poseían halos de inhibición mayor a 1 mm de diámetro, obteniendo que el 50% de las BAL presentaban antagonismo frente a *E. coli* NCTC5934, 47.1% frente a *B. subtilis* MERCK (BGA), 40.1% frente a *P. fluorescens* EP537 y 25% para *S. aureus* NCTC 4163, a diferencia de las bacterias aisladas de sangre donde el 66.9% de presentaba antagonismo frente a *S. aureus*, 53.5% frente a *Bacillus*, 17.0% frente a *P. fluorescens* y 13.3% frente a *E. coli*. Luego realizó este mismo estudio *in situ* sembrando estos microorganismos en sangre estéril, no consiguiendo reproducir la actividad inhibitoria demostrada en los ensayos en placas, pero al enriquecer la sangre con glucosa al 2%, se consiguió la inhibición de la totalidad de indicadores autóctonos y *B. subtilis* MERCK (BGA). Finalmente, las bacterias lácticas que presentaron potencial antagonista fueron identificadas mediante técnicas moleculares de PCR en 7 géneros y especies como *Lactococcus*

*garvieae*, *Enterococcus malodoratus*, *E. gilvius*, *E. raffinosus*, *Lactobacillus murinus*, *L. animalis* y *L. reuteri*., quienes fueron conservados por liofilización y atomización por ser posibles candidatos bioprotectores para aplicaciones en sangre en condiciones reales.

### 1.1.2. Nacionales

**Orejuela (2023).** Evaluó la efectividad in vitro de 8 especies de *Lactobacillus* (*L. curvatus* sp. *curvatus*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. brevis*, *L. plantarum* y *L. pentosus*) aislados de 22 muestras de quesos artesanales procedentes de 19 lugares del centro y sur del Perú, cultivados en lactosuero suplementado con glucosa y vitamina B12, contra patógenos comunes en quesos frescos como *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* enteropatógena, en el laboratorio de Microbiología de aguas y alimentos de la Universidad Nacional de Cajamarca. Obteniendo como resultado efectos bactericidas significativos con halos de inhibición mayores a 1 mm hasta 4 mm, y una eliminación extensa después de 18, 24 y 48 horas de incubación. Además, no se observó antagonismo entre las cepas de *Lactobacillus*. El aprovechamiento del lactosuero minimiza, los impactos negativos que genera al ambiente.

**Gandolfo (2021).** Evaluó la biodiversidad de bacterias lácticas nativas como *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus* spp. con capacidad antimicrobiana, aisladas de 22 muestras de quesos regionales procedentes de 10 mercados del Perú, y procesados en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de la ciudad de Lima, mediante la técnica de diluciones seriadas y siembra en agar Man Rogosa Sharpe, agar M17 y agar bilis esculina y difusión en agar. Obtuvo 175 cepas de bacterias lácticas, con una distribución porcentual de *Lactobacillus* spp. 34.86%, *Enterococcus* spp. 32.57% y *Lactococcus* spp. 32.57%. De las cepas aisladas, 19 presentaron actividad antimicrobiana, siendo el 47,4% correspondiente al género *Enterococcus*, 47,4% al género *Lactobacillus* y 5,2% al género *Lactococcus*. Siendo *Enterococcus*

*faecium* QPa2 la cepa que mostró mayor actividad inhibitoria contra *Enterococcus faecium* QPe.1 y bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Salmonella entérica* ATCC 35664. Además, las especies de *Lactobacillus sp.*, *L. plantarum* y *L. casei* presentaron mayor capacidad antimicrobiana.

**Churqui (2020).** Evaluó la carga bacteriana de *Lactobacillus sp.* y su efecto antagónico sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* aislados de quesos frescos adquiridos en los mercados Unión y Dignidad, Central y Laykakota de la ciudad de Puno y llevados al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNA-Puno. Para realizar el aislamiento de *Lactobacillus sp.* utilizó el método de recuento en placa mediante diluciones seriadas, seguido de la identificación morfológica y bioquímica de azúcares fermentables con técnica de microplaca, seguido finalmente de la evaluación de la capacidad antagónica por medio del método de Kirby Bauer sobre cepas patógenas de *S. aureus* y *E. coli* aisladas de las muestras de queso, obteniendo como resultado, gracias al análisis de estadística de varianza y prueba de Tukey mayores recuentos bacterianos en el mercado de Unión y Dignidad y en los últimos meses de muestreo, además de porcentajes de inhibición del 73.96% y 97.32% para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente.

**Quillama et al. (2020).** Seleccionaron y caracterizaron cepas nativas de *Enterococcus* con potencialidad antimicrobiana obtenidos de 14 muestras de quesos de elaboración artesanal procedentes de Ayacucho, Puno, Apurímac, Huancayo, Huancavelica, Cajamarca, Arequipa y Lima y procesados en la Universidad Nacional Agraria la Molina, en Lima, aislaron y caracterizaron fenotípicamente estas cepas por métodos bioquímicos, llegando a identificar 68 cepas de las cuales *Enterococcus faecium* se encontraba en mayor proporción, seguido de *Enterococcus durans* y *Enterococcus faecalis*. Luego se demostró su actividad antimicrobiana, por medio del método de bicapa y difusión en agar, siendo *Enterococcus faecium* QPa.1 y QPa2 muy

efectivo frente a *Listeria monocytogenes*, llegando a la conclusión de que esta posee una bacteriocina activa y específica que sugiere un potencial uso como bioprotector en la industria quesera.

**Pulido (2013).** Aisló e identificó bacterias lácticas productoras de bacteriocinas de 50 quesos frescos procedentes de la provincia de Huarochiri, departamento de Lima por el método de diluciones seriadas y diseminación con espátula de Drigalsky en agar Rogosa MRS e identificadas con el sistema API 50CH-BIOMÉRIUX, obteniendo los sobrenadantes libres de células ajustado a pH de 6.2 para enfrentarlos a cepas referenciales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*, por la técnica de difusión en agar en pocillos obteniendo como resultado la identificación de 7 especies que produjeron bacteriocinas como *Lactobacillus paracasei ssp paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus curvatus ssp curvatus* y *Lactobacillus rhamnosus*, mostrando los dos últimos mayor actividad bactericida frente a *S. pyogenes* y *S. aureus* respectivamente, y ambos para *Pseudomonas aeruginosa*.

**Cristóbal (2008).** Aisló y determinó especies de *Lactobacillus* obtenidos de 33 quesos artesanales provenientes de mercados de Lima, Lambayeque, La Libertad, Ica, Cajamarca, Ayacucho, Ancash, Cusco y Huancavelica y procesadas en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, utilizando la técnica de diluciones en serie y cultivo por diseminación en placas con Agar MRS e identificadas mediante la prueba de asimilación de carbohidratos. Además, determinó el espectro antibacteriano frente a 10 cepas bacterianas ATCC y caracterización fisicoquímica de sus bacteriocinas exponiéndolas a solución de catalasa, enzimas como pronasa,  $\alpha$ -amilasa, y lipasa y a diferentes temperaturas y pH. Obteniendo como resultado el aislamiento de 341 cepas identificadas como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*,



*Lactobacillus bulgaricus*, *L. lactis* y *Lactobacillus plantarum* de las cuales solo el 16.42% presentó actividad de inhibición, siendo la bacteriocina de *L. plantarum* el de mayor actividad, teniendo además mayor estabilidad térmica y firmeza a variaciones de pH y temperaturas de conservación.

### 1.1.3. Locales

**Peralta (2014).** Evaluó la capacidad antagónica de 75 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de 14 quesos frescos obtenidos de la comunidad Campesina de Haparquilla-Anta frente a cepas ATCC de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, mediante la técnica de diluciones en serie y pruebas de identificación tales como coloración Gram, oxidasa, catalasa y el sistema API 50CH<sup>TM</sup> (bioMérieux, Inc.) para lo cual se sometió a una prueba preliminar de antagonismo por el método de difusión en agar en pocillo para seleccionar aquellas que presentaron halos mayor a 3mm de radio, siendo luego sujetas a diferentes parámetros de temperatura, tiempo de almacenamiento y pH. Teniendo como resultado 10 cepas identificadas como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, y *Lactococcus lactis ssp. lactis*. Llegando a la conclusión que la primera especie tuvo actividad antagónica frente a ambos patógenos, *L. brevis* y *L. pentosus* tuvieron actividad frente a *L. monocytogenes* y *Lactococcus lactis ssp. lactis* para *E. coli*, no obstante, también se demostró que la actividad antagónica es mucho mejor a temperaturas de congelación y refrigeración, además no se ve afectada por el tiempo hasta antes de los 30 días y a exposiciones distintas de pH se comprueba que la actividad antagónica, está ligada a otros metabolitos.

## 1.2. GENERALIDADES

### 1.2.1. *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* desempeña un papel importante en el proceso de fermentación, por ello son muy empleados en la industria alimentaria no solo por su capacidad de acidificar, y por tanto preservar alimentos, sino también por su importancia en la textura, sabor, olor y en el desarrollo típico de alimentos fermentados (Aguirre et al., 2024).

Según el Manual de Bergey's son bacterias Gram positivas, con un tamaño aproximado de  $0.5 - 1.2 \times 1.0 - 10.0$  u, son bacterias usualmente bacilos, pero algunas veces son también cocobacilos, comúnmente se presentan en cadenas cortas, anaerobias o aerobias facultativas, mesófilas, no esporuladas, catalasa y oxidasa negativo, presenta raramente movilidad por la presencia de flagelos peritricos, con o sin producción de gas. El pH óptimo de crecimiento es de 5,5 a 5,8 pero generalmente crecen en pH menor a 5, temperatura optima de desarrollo es entre 30 a 40°C, pero pueden crecer en un rango de 5 a 53°C (Peralta, 2014). Presenta colonias entre 2 a 5mm de diámetro, de borde entero y convexo, textura lisa y brillante, son de color blanco y sin pigmento en algunos casos puede ser amarillento, y sin olor característico (Gutiérrez, 2019).

Habitan en mucosas ricas en carbohidratos, por ejemplo, en las mucosas de los animales o seres humanos como cavidad bucal, intestino y vagina y aprovechan el contenido en glucógeno y glucosa del exudado vaginal, (Vizcaíno, Macias-Tomei, Marquez, Morales, & Torres, 2016) así también se presentan en plantas y en los materiales de origen vegetal (Aguirre et al., 2024) como son los ensilajes (Okoye et al., 2023). La producción de bacteriocinas (sustancias antimicrobianas) es su principal característica, también producen; ácido acético y láctico, aminas, amoniaco, compuestos fenólicos y peróxido.

### 1.2.1.1. *Posición Taxonómica.*

Dominio: Bacteria

División: *Firmicutes*

Clase: *Bacilli*

Orden *Lactobacillales*

Familia: *Lactobacillaceae*

Género: *Lactobacillus*

Especie: *Lactobacillus sp.*

Fuente: Sauer et al. (2017)

El género *Lactobacillus* con el paso del tiempo ha resultado ser el más extenso con respecto a otros, en cuanto a nuevas especies, siendo en la actualidad más de 100 especies validadas (Rodríguez, 2018). Su principal criterio de diferenciación será la descomposición del producto final, el metabolismo de los carbohidratos puede clasificarse en; Homofermentativas, Heterofermentativas y Heterofermentativas facultativas. Según Kandler y Weiss este género se divide en 3 grupos tradicionales:

- a. **Grupo I, Lactobacilos Homofermentativos obligados;** tienen la capacidad de producir 2 moléculas de ácido láctico por una molécula de glucosa, mediante la ruta de EMP (Embden - Meyerhoff - Parnas) este grupo de bacterias poseen enzimas Aldosa y Hexosa isomerasa, pero carecen de Fosfocetolasa (Rodríguez, 2018). También pueden obtener el ácido láctico de la fructosa, con la producción mínima de productos secundarios. Las bacterias homolácticas a diferencia de las heterolácticas pueden

obtener de una determinada cantidad de glucosa aproximadamente el doble de energía, fermentan casi exclusivamente las hexosas a ácido láctico, pero no pentosas ni gluconato (Peralta, 2014). Por esta vía se produce más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa (Parra, 2010). Ejemplo: *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii subesp. Blugaricus*, *L. delbrueckii subesp. lactis*, *L. helveticus*, *L. sensenii*, *L. farmicinis*, *L. salivarius subesp. salivarius*, *L. gaserii*, *L. gallinarium*.

- b. Grupo II, Lactobacilos Heterofermentativos facultativos**, estas bacterias utilizan la vía de las pentosas fosfato o EMP, degradan hexosas casi exclusivamente a ácido láctico por esta vía, o en el caso de algunas especies hasta ácido acético, láctico, fórmico y etanol bajo limitantes de glucosa, también pueden generar ácido láctico y acético a partir de pentosas mediante la ruta Fosfocetolasa o 6-p-glucanato. Ejemplo: *Lactobacillus acetotolerans*, *L. hamsteri*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, *L. sake*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus*, *L. alimentarius*, *L. agilis*.
- c. Grupo III, Lactobacilos Heterofermentativos obligadas**, estas bacterias no tiene la enzima fructosa- difosfato- aldosa, pero cuentan con la enzima Fosfocetolasa, por ello pueden degradar la glucosa por la vía llamada de Hexosas fosfato o pentosas fosfato, produciendo a partir de las hexosas cantidades ínfimas (equimolares) de ácido acético, láctico, dióxido de carbono y etanol, degradan las pentosas para obtener ácido acético y láctico (Peralta, 2014). Producen solamente el 50% de ácido láctico, por cada molécula de glucosa, forman 1 molécula de ácido láctico, 1 molécula de etanol y 1 molécula de CO<sub>2</sub> (Parra, 2010).

Este grupo tiene mayor importancia desde el punto de vista industrial porque brindan características sensoriales a los alimentos en el aroma y sabor con la producción de acetoaldehidos

y diacetilo. Ejemplo: *Lactobacillus bevis*, *L. fermentum*, *L.buchneri*, *L.reuteri*, *L. hilgardii*, *L. trichodes*, *L. malefermeyans*, *L. sanfrancisco*, *L. kéfir*, *L. Fructivorans*, *L. collinoides*. (Peralta, 2014).

### **1.2.2. Bacteriocinas**

Son metabolitos producidos por las BAL, investigadas por considerarse como una alternativa de bio-conservación para aminorar el empleo de conservadores químicos y preservar la calidad y ampliar la vida útil de los productos (Moreno, 2024). Se definen como péptidos de origen ribosomal, son secretados al medio extracelular y tienen capacidad antimicrobiana (Bulla & Carreño, 2023) es decir inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Heredia et al., 2017).

#### **1.2.2.1.Características Generales.**

Las bacteriocinas representan un grupo Heterogéneo de péptidos antimicrobianos, es así que solo se han constituido dos principales categorías con base a sus modificaciones estructurales, su tamaño, su termoestabilidad y sus mecanismos de acción clase I lantibioticos y clase II no Lantibioticos (López et al., 2008).

Las bacteriocinas según Heredia et al., (2017), son péptidos extracelulares producidas por los ribosomas; son sintetizados por bacterias Gram positivas y negativas y se cree que el 99% de las bacterias puede sintetizar al menos una bacteriocina.

El efecto: *in vitro*; no es tóxica para las líneas celulares normales, puede llegar a ser tóxica para las células cancerosas. *In vivo*, no es tóxico para animales y humanos (se inactivan por proteasas digestivas), no son capaces de estimular el sistema inmune

Espectro de acción, pueden actuar sobre bacterias Gram negativas como positivas como, por ejemplo; *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureu*, *Cl. Botulinum*, *Pseudomonas*, *Ent. fecalis*; *Salmonella spp* entre otros.

Modo de actividad, las bacteriocinas tienen la capacidad de actuar como Bactericida, bacteriostático y fungicida (Heredia et al., 2017).

Algunas características mencionadas por Heredia et al., (2017) se puede ver en la siguiente tabla.

**Tabla 1**

*Características generales de las bacteriocinas*

| CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS BACTERIOCINAS             |  |
|--|--|
| Origen   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Origen ribosomal; péptidos extracelulares producidos por bacterias Gram positivas y Gran negativas.</li> <li>• Se estima que el 99% de las bacterias son capaces de sintetizar cuando menos una bacteriocina.</li> </ul>  |
| Efectos  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i>: no toxica para líneas celulares normales; toxica para células cancerosas.</li> <li>• <i>In vivo</i>: no estimula el sistema inmune; no toxica en modelos animales y humanos (se inactivan por proteasas digestivas).</li> </ul>  |
| Espectro de acción   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pueden actuar contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.</li> <li>• Algunas bacterias patógenas susceptibles son <i>E. coli</i>, <i>L. monocytogenes</i>, <i>S. aureus</i>, <i>Cl. botulinum</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Ent. fecalis</i>, <i>Salmonella spp</i>.</li> </ul>             |
| Modo de actividad  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bactericida, bacteriostático y fungicida.</li> </ul>  |
| Mecanismo de acción  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Permeabilización de la membrana (pérdida del potencial de membrana, consumo de reservas energéticas celulares, disminución en la síntesis de DNA, RNA y proteínas).</li> <li>• Lisis celular</li> </ul>   |
| Estructura química   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Péptidos; glicoproteínas y lipoproteínas.</li> </ul>  |
| Peso molecular   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gram negativas; son de tamaño muy variable y pueden alcanzar hasta los 80 kDa.</li> <li>• Gram positivas: por lo general su tamaño es menor a los 10 kDa, aunque se han reportado valores más altos.</li> <li>• Archea: su tamaño puede llegar a alcanzar aproximadamente los 20kDa.</li> </ul> |
| Carácter   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrofóbico.</li> <li>• Anfipático.</li> </ul>  |
| pI   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• De 8,1 a 10,0</li> </ul>  |
| Localización de genes que codifican para las bacteriocinas | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Plásmidos.</li> <li>• Cromosomas.</li> <li>• Transposones; ambos (plásmidos y cromosomas).</li> </ul>   |
| Sensibilidad a enzimas                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Todas son sensibles a las enzimas proteolíticas, tales como la pepsina, tripsina y pronasa.</li> </ul>  |
| Sensibilidad a temperaturas                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Compuestos termoestables; la mayoría soporte 100 – 121 °C durante 15-30 min.</li> </ul>   |
| Sensibilidad a pH  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• La mayoría de las bacteriocinas son estables en el intervalo de pH 3,0 a 9,0</li> </ul>   |

*Nota:* BAL: Bacterias ácido lácticos, pI: punto isoeléctrico. Adaptado de Vázquez *et al* (2009), Józefiak y Sip (2013), Bemena *et al.* (2014), Veskovíe *et al.* (2014) y Favaro *et al* (2015).

### 1.2.2.2. Clasificación de las bacteriocinas

**a. Clase I**, también llamados lantibióticos de amplio espectro y con modificaciones post-traduccionales, (N. Agudelo et al., 2015) son péptidos de bajo peso molecular, menor a 5 kDa, se caracterizan por ser resistentes a altas temperaturas y por estar conformados por aminoácidos no comunes como lantionina, metillantonina, dehidroxilamina y dehidrobutirina. Pueden encontrarse de forma Tipo A-lineal o en forma tipo B- globular (Balciunas et al., 2013).

**b. Clase II**, péptidos pequeños termoestables, menor a 10 kDa, no presentan aminoácidos modificados en su estructura, esta se subdivide en 5 subclases (Balciunas et al., 2013).

Subclase IIa, la pediocina PA-1 es la bacteriocina más representativa, actúa fuertemente contra la *Listeria*.

Subclase IIb, son bacteriocinas formadas por dos péptidos, por ejemplo, Plantaricina EF

Subclase IIc, estas bacteriocinas no comparten homología con ninguna otra bacteriocina, como la Lactococcina A

Subclase IId, son péptidos lineales, ejemplo la Lacticina Q.

Subclase IIe estas bacteriocinas se formaron de la degradación específica de proteínas más grandes, en esta subclase se encuentra la Propionicina F.

**c. Clase III**, son péptidos termolábiles de alto peso molecular, mayor a 30 kDa, la bacteriocina representativa de esta clase es la Helveticina (Balciunas et al., 2013).

- d. **Clase IV**, son péptidos grandes y están unidos o asociados a carbohidratos (glicoproteínas) o a lípidos (lipoproteínas), por ejemplo, la Lactocina S (Balciunas et al., 2013).
- e. **Clase V**, estas bacteriocinas presentan su estructura de forma circular y no posee modificaciones por traduccionales. Como ejemplo esta la Enterocina AS-48

**Tabla 2***Clasificación de bacteriocinas*

| BACTERIOCINA                                     | PRODUCTOR                       | ESPECTRO DE INHIBICIÓN | TAMAÑO (NÚMERO DE AMINOÁCIDOS) |
|--|---------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| <i>Clase I: Lantibióticos</i>                    |                                 |                        |                                |
| Nizina (a y Z)                                   | <i>Lactococcus lactis</i>       | Amplio                 | 34                             |
| Lacticina 481                                    | <i>Lactococcus lactis</i>       | Amplio                 | 27                             |
| Lactocina S                                      | <i>Lactobacillus sake</i>       | Amplio                 | 37                             |
| Carnocina u149                                   | <i>Camobacterium piscicola</i>  | Amplio                 | 35-37                          |
| <i>Clase II: No Lantibióticos. Termoestables</i> |                                 |                        |                                |
| Lactococcina A                                   | <i>Lactococcus lactis</i>       | Estrecho               | 54                             |
| Lactococcina B                                   | <i>Lactococcus lactis</i>       | Estrecho               | 47                             |
| Lactacin F                                       | <i>Lactobacillus johsonii</i>   | Estrecho               | 57 – 48                        |
| Plantaricina                                     | <i>Lactobacillus planctarum</i> | Amplio                 | 34                             |
| Sakacina P                                       | <i>Lactobacillus sake</i>       | Amplio                 | 41                             |
| PEDIOCINA AcH                                    | <i>Pediococcus acidilactici</i> | Amplio                 | 44                             |
| Divergicina M35                                  | <i>Camobacterium divergens</i>  | Amplio                 | 43                             |
| Enterocina P                                     | <i>Enterococcus faecium</i>     | Estrecho               | 44                             |
| <i>Clase III: Mayor Tamaño, Termolábiles</i>     |                                 |                        |                                |
| Helveticina J                                    | <i>Lactobacillus helveticus</i> | Estrecho               | 333                            |
| <i>Clase IV: Moléculas complejas</i>             |                                 |                        |                                |
| Circularina A                                    | <i>Geobacillus kaustophilus</i> | -                      | 76                             |

Nota. En la Tabla 2 se presentan algunas bacteriocinas representativas. *Tomado de Agudelo et al., (2015).*

### 1.2.2.3. Mecanismo de acción.

La bacteriocinas por lo general actúan sobre la membrana de las células sensibles, desequilibrando y permealizando a través de la formación de canales o poros iónicos mencionado por (Grande et al., 2005, como se citó en Mondragón et al., 2013)



El mecanismo de acción de las bacteriocinas inicia cuando se forman poros en la membrana de la célula, este proceso comienza cuando la bacteria diana o blanco atrae a las bacteriocinas hacia ella mediante las fuerzas electrostáticas, las bacteriocinas están cargadas positivamente, es así que van a interactuar con los fosfolípidos de la membrana que estos se encuentran cargados negativamente, distribuyéndose a lo largo de la superficie de la membrana celular, gracias a la naturaleza anfipática de las bacteriocinas, de la bacteria diana (Heredia, Hernandez, Gonzalez, et al., 2017).

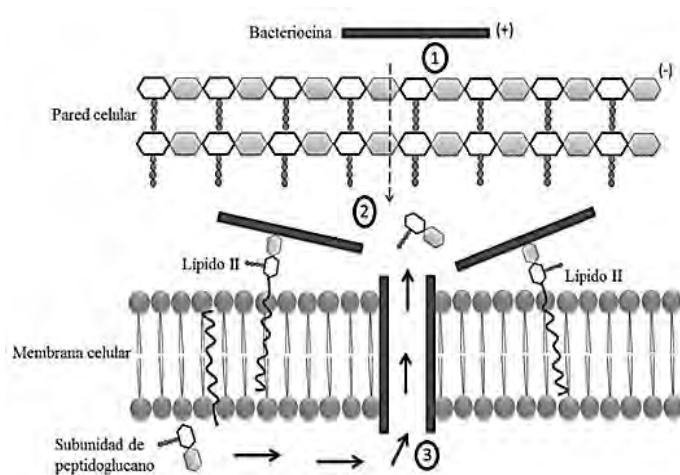
La región N-terminal (región hidrofílica) de la bacteriocina se integra a la superficie polar de la membrana celular de la bacteria diana. Una vez unida, la región C-terminal (región hidrofóbica) ingresa en el interior no polar de la membrana celular, generando la formación de poros en la membrana y con ello un drenaje intracelular, con pérdida de iones potasio (K), de energía (ATP) de aminoácidos y moléculas de bajo peso molecular. Como resultado de ello, habrá disminución del potencial de membrana y la insuficiente disponibilidad de reservas energéticas de la bacteria, por lo cual la disminución de síntesis de ADN, ARN y proteínas, que dará como consecuencia final la muerte de la bacteria.(Heredia et al., 2017).

**Mecanismo de acción de las bacteriocinas de la clase I.** En la Figura 1, se observa el mecanismo de acción de la nisina, esta bacteriocina de acción dual, la primera etapa empieza cuando la nisina se adhiere a la pared celular por atracciones electroestáticas, luego la nisina se une al lípido II que es el transportador principal de las subunidades de peptidoglicano, esta unión es útil para anclarse firmemente a la membrana, la bacteriocina cambiará su orientación en relación con la membrana y se insertará, la unión de los diversos péptidos en el sitio de inserción genera la formación de un poro llamado “poro transmembranal” el cual permite que la bacteria pierda

sustancias vitales como aminoácidos y ATP (energía), y tendrá como consecuencia muerte celular (López et al., 2008, como se citó en Mondragón et al., 2013).

### Figura 1

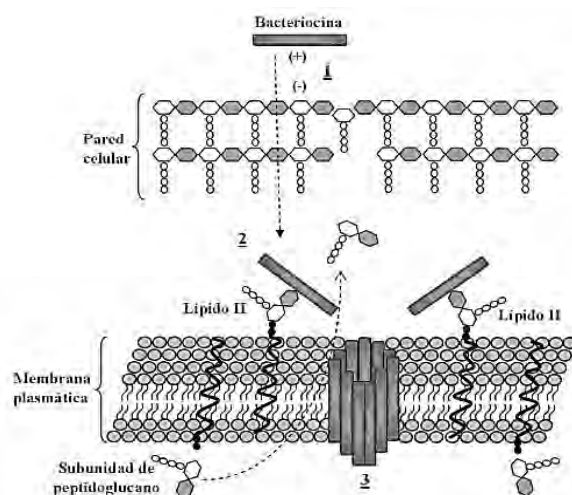
*Representación gráfica del mecanismo de acción dual de la nisina*



*Nota. Etapa I. Tomado de López et al. (2008)*

### Figura 2

*Representación gráfica del mecanismo de acción dual de la nisina*



*Nota. Etapa II. Tomado de (López et al., 2008).* En esta imagen se puede observar un modelo que ilustra como la nisina de *Lactococcus lactis* actúa de manera dual. En la primera etapa, la nisina

(carga positiva), interactúa con las cargas negativas de la pared celular. Posteriormente, la nisina se adhiere al lípido II, transportador del peptidoglucano desde el citoplasma a la pared celular, esta unión interfiere con su síntesis, llevando a la bacteria a muerte celular. En la última etapa, varias moléculas de nisina utilizan al lípido II para anclarse e insertarse en la membrana celular e iniciar la formación de los poros, lo que conlleva a muerte celular.

**Mecanismo de acción de las bacteriocinas de la clase II**, se diferencia porque su actividad bactericida es por la desestabilización de las funciones de la membrana celular de las bacterias o células sensibles. (González et al., 2003).

**Mecanismo de acción de las bacteriocinas de la clase III**, según Lai et al., 2002 citado por (Mondragón et al., 2013) este tipo de bacteriocinas promueven la lisis de la pared celular de la bacteria sensible. El extremo C-terminal es el encargado de identificar o reconoce a la célula objetivo, por otro lado, la región N-terminal es semejante a una endopeptidasa que participa en la síntesis de la pared celular.

#### **1.2.2.4. Bacteriocinas representativas.**

##### ***Nisina***

Es la primera bacteriocina identificada en 1928, obtenida de *Lactococcus lactis subsp lactis*, siendo ampliamente utilizada como un conservador de alimentos. Se produce naturalmente en ciertos productos lácteos y se utiliza como aditivo para evitar la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, como las de los géneros *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* y *Lysteria*. Es un péptido pequeño, consta de 34 aminoácidos y con un peso molecular menor a 5 kDa. Su síntesis es un proceso complejo que incluye transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, secreción, procesamiento, y señales de transducción. Existen dos variantes de

esta bacteriocina, la nisina A y la nisina Z, que difieren solamente en el aminoácido de la posición 27, la histidina en la nisina A cambia por asparagina en la nisina Z (González et al., 2003).

### ***Pediocina.***

Esta bacteriocina es sintetizada por especies del género *Pediococcus* como *Pediococcus acidilactici*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, entre otros y también por *Lactobacillus plantarum* que se encuentra naturalmente en el queso (Bulla & Carreño, 2023). Es efectiva principalmente frente a un grupo pequeño de bacterias Gram positivas por ejemplo algunas especies de los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Además, posee actividad frente a otras bacterias Gram positivas, como aquellas que son causantes de tox infecciones alimentarias por ejemplo *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria* y *Brochotrix*. Aunque las bacterias Gram negativas gracias sus cubiertas celulares pueden impedir el acceso de las bacteriocinas a la membrana plasmática, sin embargo, la pediocina al igual que la nisina, puede alterar la permeabilidad de sus membranas externas para permitir la acción antimicrobiana de estas bacteriocinas (N. Agudelo et al., 2015). La pediocina tiene un mecanismo de acción similar a la nisina, se une a un receptor específico en las membranas celulares para poder generar un poro y despolarizar a la bacteria diana interrumpiendo sus funciones vitales (Papagianni y Anastasiadou, 2009, como se citó en N. Agudelo et al., 2015).

La pediocina es utilizada como conservador en productos vegetales y cárnicos, y por su elevada actividad contra especies de *Listeria* tiene un alto potencial para ser utilizada como conservante en alimentos lácteos (González, et al., 2003).

### ***Helveticina J.***

Esta bacteriocina es producida por *Lactobacillus helveticus*, un microorganismo que se encuentra de manera natural en quesos madurados y en algunos alimentos fermentados (González

y otros, 2003). Forman parte de la clase III de las bacteriocinas conocidas como bacteriolisinas, este grupo es uno de los menos estudiadas, presenta solo 5 miembros caracterizados completamente (Zhang et al., 2013 como se citó en N. Agudelo et al., 2015). Se identificaron dos tipos de helveticina, M y J, son producidas por las especies *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus* y *Enterococcus faecalis*. Se conoce que la helveticina M actúa en la membrana externa de las bacterias siendo eficaz frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas (Moreno, 2024)..

#### **1.2.2.5. Rango de Acción de las Bacteriocinas**

Las bacteriocinas actúan sobre microorganismos relacionados o presentes en su ambiente (Grande et al., 2017); esto hace que los microorganismos patógenos muestren diferente sensibilidad ante la presencia de la bacteriocina. Como ejemplo, la nisina presenta un amplio espectro de acción hacia bacterias Gram positivas, incluyendo *S. aureus* y *L. monocytogenes*, también evita la esporulación de *Bacillus spp.* y *Clostridium spp.* (Jurado & Jarrín, 2015; Sierra et al., 2013).

**Tabla 3***Tipos de bacteriocinas y microorganismo productor*

| BACTERIOCINA       | MICROORGANISMO PRODUCTOR              | FUENTES DE AISLAMIENTO          | ANTAGONISMO SOBRE   | REFERENCIA                     |
|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---|--------------------------------|
| SAKASAKIN 2        | <i>Lantobacillus sake</i> C2          | Bebida de col fermentada        | <i>L. acidophilus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Sarcina flava</i> , <i>L. innocua</i> .              | Gao <i>et al.</i> , 2010       |
| LPBM 10            | <i>L. plantarum</i> LPBM10            | Leche fermentada                | <i>B. cereus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i>  | Zapata <i>et al.</i> , 2009    |
| WEISSELLIN A       | <i>Weissella paramesenteroides</i> DX | Salchichas                      | <i>L. monocytogenes</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>L. innocua</i> , <i>Clostridium sporogenes</i> | Papagianni y Papamichael, 2011 |
| PLANTARICINA 35D   | <i>L. plantarum</i>                   | Salchichas                      | <i>Aeromonas hydrophila</i>   | Messi <i>et al.</i> , 2001     |
| ST28MS Y ST26MS    | <i>L. plantarum</i>                   | Melaza                          | <i>Escherichia coli</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i>  | Todorov y Dicks 2005           |
| LPBM 10            | <i>L. plantarum</i> LPBM10            | Leche fermentada                | <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Serratia marcescens</i>     | Zapata <i>et al.</i> , 2009    |
| BACTERIOCINA       | <i>Enterococcus faecium</i> 130       | Queso mozzarella                | <i>L. monocytogenes</i>   | Tulini <i>et al.</i> , 2011    |
| BACTERIOCIN ST16PA | <i>Lactobacillus plantarum</i> ST16Pa | Papaya ( <i>Carica papaya</i> ) | <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. sakei</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>            | Todorov <i>et al.</i> , 2011   |

*Nota.* La Tabla 3 detalla diversas bacteriocinas e indica alimento del que se aislaron el microorganismo productor y el efecto bactericida sobre Gram positivas y negativas. *Tomado de Osuna Castro et al., (2013).*

#### **1.2.2.6. Factores que afectan la eficacia de la bacteriocina.**

La actividad de las bacteriocinas no es constante ni uniforme, depende de la composición química y condiciones físicas de los alimentos, el principal factor es el pH (Castellanos et al., 2022), que va reducir la unión de la bacteriocina a los componentes de los alimentos, la adsorción a las células, la actividad de las proteasas y otras enzimas según Schillinger, Geisen y Holzapfel, 1996, citado por Balciunas et al., 2013, también puede verse afectado por los componentes de los alimento, además por las condiciones de procesamiento y almacenamiento así como por la temperatura del producto el aumento; porque aumenta la actividad de las proteasas. Según mencionan Drosinos, Mataragas, Nasis, Galiotou y Metaxopoulos (2005) citado por Balciunas et

al., 2013) el pH óptimo para la producción de bacteriocinas es de 5,5 y no coincide con el pH del crecimiento microbiano que es 6,5 por ejemplo la actividad de la nisina aumenta cuando se utiliza en alimentos ácidos debido a que tienen una máxima estabilidad en condiciones ácidas, es así que para las aplicaciones de nisina sean efectivas requieren que el pH de los alimentos sea inferior a 7 para garantizar una solubilidad y estabilidad satisfactorias durante el procesamiento y el período de almacenamiento (Hernandez et al., 1993).

La eficacia también está relacionada con el nivel de contaminación con los microorganismos patógenos, si esta es demasiado alta al inicio, la actividad de la bacteriocina es baja por lo tanto no se podrá evitar el desarrollo de microorganismos contaminantes (Rilla et al., 2004).

### **1.2.3. Quesos**

Según el Codex Alimentarius (Gonzáles, 2018) Es el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, se obtiene mediante procesos de coagulación de la proteína de la leche, estos son:

- a. Coagulación total o parcial de la proteína de la leche**, leche desnatada/descremada, leche parcialmente desnatada/descremada, nata (crema) de suero o leche de mantequilla/manteca, o de cualquier combinación, el proceso de coagulación se realiza por la acción del cuajo u otros coagulantes apto, como consecuencia de dicha coagulación se separa el suero, generando una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) lo que resulta en queso que debe tener mayor

contenido proteico, que la mezcla de los ingredientes lácteos en base a la cual se elaboró el queso (Gonzáles, 2018).

- b. Técnicas de elaboración que implican la coagulación de la proteína** presente en la leche o en productos derivados de la leche, resultado en un producto final con las mismas propiedades organolépticas como también las características físicas y químicas que el producto definido por la coagulación total o parcial (Gonzáles, 2018)

El queso es un alimento que aporta una gran cantidad de nutrientes en relación a su contenido calórico (De Cangas et al., 2019), tiene un amplio consumo a nivel mundial, sus características nutritivas, funcionales, texturales y sensoriales difieren entre cada tipo de queso (Abarca, 2018). Se estiman más de 2000 variedades de queso, entre madurados, semi madurados y frescos (Gunasekaran & Ak, 2003; Ramírez & Vélez, 2012).

#### **1.2.3.1. Tipos de quesos**

En el mundo existen diferentes tipos de quesos, esta variabilidad se da por los diferentes métodos de elaboración, tipo de leche, condiciones de maduración (como la humedad y temperatura) y por la adición de enzimas o microorganismos (Rodiles, Ochoa & Zamora, 2023).

##### **a. Queso sometido a maduración**

Es el queso que requiere un periodo de maduración, después de su elaboración debe conservarse a una temperatura y en condiciones específicas tales que se ocurran los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos del queso (Gonzáles, 2018).

##### **b. Queso madurado por mohos:**

Es un queso que se producido como consecuencia del desarrollo característico de mohos por todo el interior y/o sobre la superficie del queso (Herrera et al., 2023).



***c. Queso sin madurar***

Es el queso que está listo para el consumo poco después de su fabricación (González, 2018).

***d. Queso de suero:***

Estos quesos pueden ser productos sólidos, semisólidos o blandos que son obtenidos por medio de uno de los siguientes procesos; la concentración de suero y el moldeo del suero concentrado y la coagulación térmica del suero con la adición de ácido o sin ella (González, 2018).

***e. Queso artesanal:***

Es el queso elaborado con leche cruda, pasteurizada, o termizada en el predio, exclusivamente, siendo el productor la persona física o jurídica que elabora queso artesanal en forma individual, familiar o asociativa. (Borbonet & Urrestarazu, 2010)

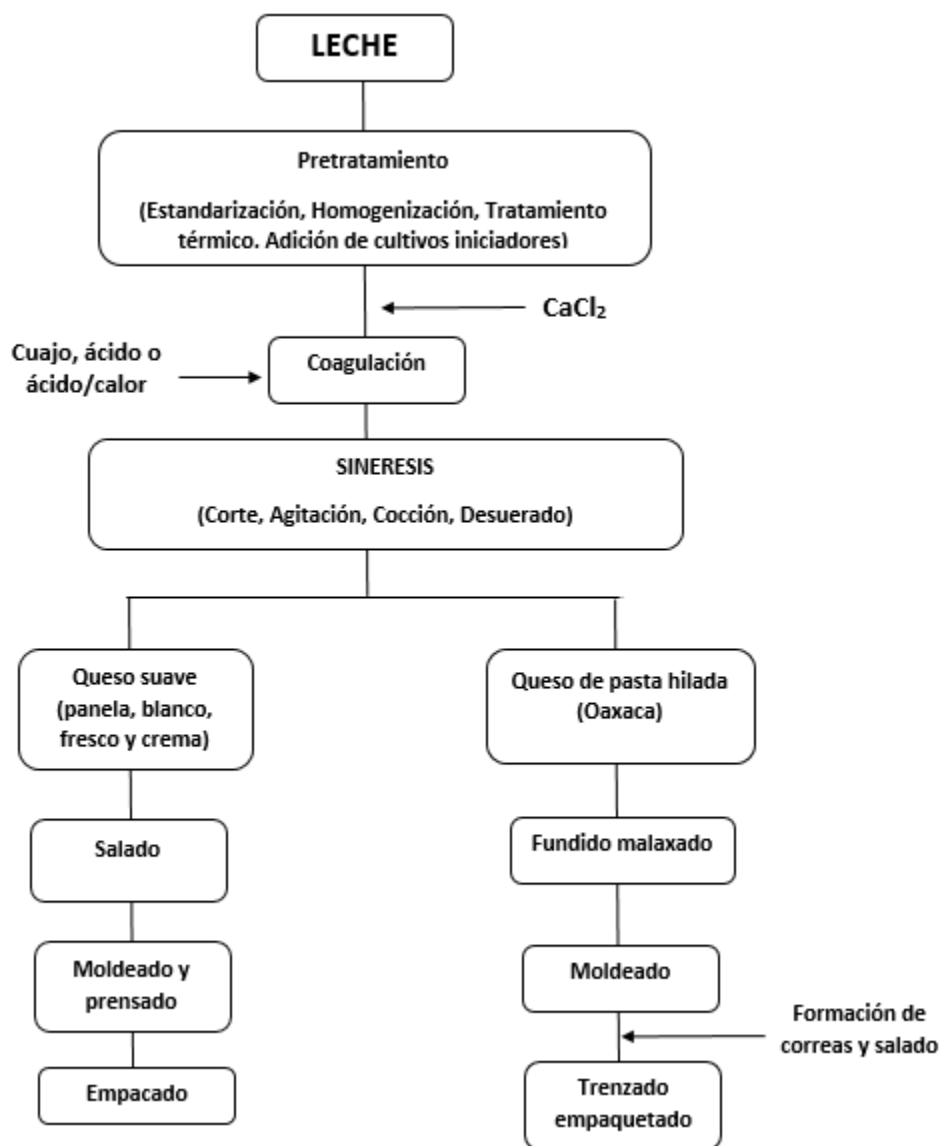
**1.2.3.2. Proceso de elaboración del queso.**

El proceso de elaboración del queso es bastante simple, no obstante, involucra fenómenos físicos y químicos muy complejos. Se trata esencialmente de un proceso de concentración, a partir de la coagulación de la proteína mayoritaria de la leche (caseína) por la acción enzimática (cuajo) u otro coagulante de tipo ácido (comúnmente ácido láctico) (Ramírez & Vélez, 2012)

El siguiente diagrama muestra un esquema para la elaboración del queso fresco. Para el caso de otros tipos de queso la temperatura variará, así como será necesario una preacidificación de la leche, el cual se logra por la adición de cultivos iniciadores. (Caro et al., 1998, como se citó en, Ramírez & Vélez, 2012).

**Figura 3**

*Diagrama general del proceso de elaboración de queso fresco*



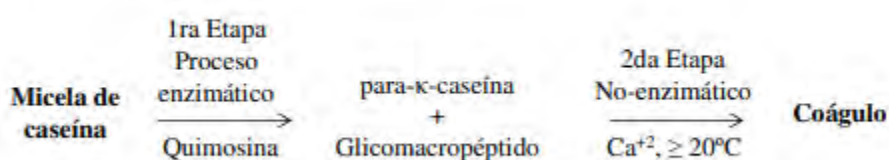
*Nota.* Tomado de Gunasekaran y Ak, (2003).

Según Ramírez & Vélez, (2012). Un paso fundamental en la elaboración de los quesos es la coagulación de la caseína, lograda mediante la acción conjunta de enzimas proteolíticas (cuajos) y calcio. El proceso de formación del coágulo incluye 2 etapas:

En la primera, se desarrolla un proceso enzimático modulado por la quimosina, la cual rompe los enlaces entre los aminoácidos fenilalanina y metionina (Fen-105 y Met-106) presentes en la  $\kappa$ -caseína, liberándose el glicomacropéptido en la solución. En la segunda etapa, los agregados de para- $\kappa$ -caseína producen el coágulo (Udayarajan, 2007).

#### Figura 4

##### *Formación del coágulo de caseína*



*Nota.* Tomado de Udayarajan, (2007).

Hasta la etapa de coagulación, los procedimientos básicos en la elaboración de los diferentes tipos de quesos son muy similares; sin embargo, las etapas siguientes varía de acuerdo con el tipo de queso a producir (Ramírez & Vélez, 2012).

Después de la coagulación de la leche, se hace cortes verticales y horizontales en el coágulo, para facilitar la eliminación del suero (proceso también conocido como desuerado). Luego se procede a su moldeado (Ramírez & Vélez, 2012).

El moldeado del queso es importante para darle forma y ayudar a que los gránulos de la cuajada se unan.(Datsa, 2017). Los moldes pueden ser de diferentes formas y se utilizan para aplicar presión al queso durante el proceso de prensado. En algunos casos, como en quesos frescos, la presión necesaria la proporciona el propio peso del queso. El salado del queso no solo le da sabor, sino que también ayuda a mantenerlo libre de microorganismos y contribuye a la formación

de su corteza. Se utiliza sal cristalizada o salmueras con diferentes concentraciones según el tipo de queso (Ramírez & Vélez, 2012).

#### **1.2.4. Cuajo**

Es el producto que se obtiene directamente de los cuajares o abomasos de rumiantes cuyo principal componente activo está constituido por quimosina pura o en mezcla con pepsina (Perez, 1996; Ferrandini, 2006, como se citó en Mujica & Hernández, 2023).

En la actualidad se viene utilizando también el cuajo recombinante de origen microbiano o animal, que se comercializa en forma de tabletas (Jacob et al., 2011).

El cuajo contiene a la enzima llamada Rennina (también conocida como quimosina) cuya función es de separar la caseína (80% aproximadamente del total de las proteínas) de su fase líquida (agua, proteínas del lactosuero y carbohidratos), también llamado suero (Alva, 2016).

##### **1.2.4.1. Características.**

El cuajo, es una solución formada principalmente por las enzimas: quimosina y pepsina, las cuales son segregados por la mucosa interna del abomaso (cuarta cavidad del estómago) de los rumiantes en estado de lactancia (De Soroa, 1990; Espinoza (1981), menciona las siguientes características del cuajo citado por (Córdova, 2009).

- Resiste la acción de los ácidos.
- Se altera en presencia de luz.
- Su temperatura óptima de actividad es 400 C y la destrucción es 600 C.
- El pH óptimo de su acción es de 5,5 – 6,0.

Ahora bien, sabido es que los rumiantes tienen cuatro estómagos y que el primero que funciona con más actividad, es el que recibe la leche, que por esto se denomina cuajar, de aquí el nombre de cuajo, remontándonos a los tiempos en que el humilde pastor observa estas cosas en la naturaleza, nota en los procesos de la digestión de la leche de los animales que maman todavía, que apenas la leche llega al estómago es coagulada y transformada en una masa apelotonada, de fácil digestión (Aran, 1994). Existen dos tipos de preparaciones de coagulantes de origen animal. El cuajo natural hecho por el mismo fabricante de quesos, que se extrae del cuarto estómago (cuajar) del ternero, cordero o cabrito lactante, presentándose en líquido o en pasta y el cuajo comercial, preparado industrialmente, obtenido antes del destete, el cual es más puro, de mayor poder coagulante y se presenta en forma de polvo, tableta o líquido (Dubach, 2000). La enzima coagulante recibe diferentes nombres en distintos países, por ejemplo en Francia se llama “Présure” y en España “Cuajo” que se refiere específicamente a la preparación enzimática obtenida de cuajares de rumiantes jóvenes; en otros países se utiliza el término “Rennet” (inglés) o Lab (alemán) para referirse a cualquier preparación enzimática que coagule la leche (Córdova, 2009).

#### **1.2.4.2. *Abomaso adulto***

El abomaso adulto en bovinos alcanza su tamaño a los 5 a 6 meses de edad. Su posición es paramedial izquierda en los rumiantes adultos, de este abomaso se secreta la renina o quimosina conocida como cuajo; y es utilizada de forma artesanal en la elaboración de quesos frescos (Rivera 2012 como se citó en (Celis, 2019).

#### **1.2.4.3. *Componentes enzimáticos del abomaso***

El abomaso, conocido como renina, se compone de enzimas que pertenecen al grupo del aspartato proteinasas. Pepsina A, Pepsina B, Gastricina y quimosina. La quimosina se presenta de

dos formas, A y B. La quimosina y la 13 pepsina se hallan en mayor proporción que la gastricsina, cuya actividad frente a la caseína no ha sido muy estudiada (Ferradini et al., 2007; Celis, 2019)..

#### **1.2.4.4.Preparación del Cuajo de Alpaca.**

Los abomasos o cuajares de alpaca los provienen principalmente de crías fallecidas al nacer o de fetos abortados de 5 a 7 meses de edad gestacional (Mujica & Hernández, 2023). La técnica para la obtención del cuajo animal al ser una actividad artesanal se diferencia de acuerdo con costumbres y características de cada región donde se realice (Contreras, 2025). En todos los casos se hace una disección abdominal al animal, se extrae el estómago y se separa el abomaso o cuajar y luego se lleva a desecación. El secado dura normalmente una a dos semanas, puede llegar a conservarse hasta 3 a 6 meses antes de usarse. Para hacer uso o activar el abomaso o cuajar seco, se sumerge en el suero de la leche que se produce por 2 a 3 días, luego se corta en trozos pequeños y se deja macerar por uno o dos días adicionales para favorecer la extracción y activación de las enzimas coagulantes (Mujica & Hernández, 2023).

### **1.2.5. Cepas ATCC**

#### **1.2.5.1.*Escherichia coli* ATCC 25922**

Es una bacteria referencial que se emplea para pruebas de sensibilidad antimicrobiana, control en pruebas de resistencia antibióticos y control negativo en pruebas de BLEE y screening, y fue aislada de una muestra clínica humana recopilada de Seattle y Washington en 1946. Es del serotipo O6 y biotipo 1 (Minogue et al., 2014).

También es usada en otras pruebas de control según el CLSI, como pruebas de medios de cultivo, control negativo de producción de toxina LT, control de calidad de productos para Abbott, API, bioMeriux VITEK, MicroScan, entre otros (American Type Culture Collection, 2024).

#### **1.2.5.2. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Es una cepa que no produce beta-lactamasas, con genoma completo secuenciado, que tuvo su origen en Seattle (1945) y es empleado como control de calidad en diversas pruebas como análisis de concentrado de humo de leña, prueba CAMP, evaluación de agar Mueller-Hinton, análisis de productos lácteos, difusión en disco según CLSI o control de calidad para productos de Abbott y Autobac (ATCC, 2024; Araya et al., 2015).

## **CAPITULO II**

### **MATERIALES Y METODOLOGÍA**

#### **2.1. ÁREA DE ESTUDIO**

El muestreo para el presente estudio se realizó en el mercado ferial de los domingos del centro poblado del Distrito de Ocongate, perteneciente a la provincia de Quispicanchis, Departamento y Región Cusco, con coordenadas 13°37'24''S y 71°23'07''O y una altitud aproximada de 4130 m (Municipalidad distrital de Ocongate, 2019).

Según la Estación Meteorológica de Ccatcca, la temperatura promedio anual de este distrito es de 8,9°C, el periodo de lluvias marcadas se encuentran entre los meses de diciembre a enero llegando a 595,1 mm de lluvia por año, es decir el 72,4% de la totalidad de lluvias que precipitan anualmente, siendo el otro 27,6% el total de los ocho meses restantes que representan a la época de sequía (Loayza, 2019).

La actividad socioeconómica del Distrito de Ocongate se basa en la elaboración artesanal de alimentos como quesos artesanales y producción industrial de productos lácteos y derivados, además de la ganadería representada por camélidos, y la producción agrícola como la papa y el maíz (Loayza, 2019).



**Figura 5**

*Mapa de ubicación del Mercado Ferial de Ocongate*



*Nota. Tomado de Satélite CNES , Plaza principal del distrito de Ocongate, Airbus, 2021, Google Earth*

<https://earth.google.com/web/@-13.62631323,-71.38799159,3543.14475529a,416.58304564d,35y,-0h,0t,0r>

## **2.2. MATERIALES**

### **2.2.1. Muestra**

30 muestras de Quesos frescos de elaboración artesanal provenientes del mercado ferial de Ocongate.

### **2.2.2 MATERIAL BIOLÓGICO**

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Lactobacillus sp.* aislados en la investigación

### **2.2.3 MATERIALES DE LABORATORIO**

#### ***EQUIPOS Y APARATOS***

- Estufa TOMOS ODHG9123A
- Horno LABOR MOD. LP301
- Autoclave PHOENIX
- Microscopio CALS ZEISS
- Balanza analítica A&D (GR-200)
- Balanza A&D F2-1200i
- Refrigeradora Electrolux 4
- pH metro HANNA instruments HI 8519N
- Incubadora JEOTECH BL1200S
- Vernier digital KAMASA KM-447
- Espectrofotómetro NV203 spectrophotometer

***MATERIAL DE VIDRIO***

- Placas Petri estériles de 100 x 20 mm
- Frascos Schott/frascos bacteriológicos de 250 mL y 500 mL
- Probetas de 50 y 100 mL
- Tubos de ensayo de 16 x 160 mm
- Tubos con tapa rosca de 16 x 100mm
- Pipetas de vidrio estériles de 1mL, 5mL y 10mL
- Espátulas de Drigalsky
- Láminas cubre y porta objetos

***REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO***

- Peróxido de hidrógeno al 30% ERZA
- Bateria de coloración Gram CHEMICAL soluciones
- Rojo de metilo SIGMA
- Tiras reactivas para oxidasa MERCK
- Discos de antibióticos (Ampicilina, Amoxicilina + Ácido Clavulánico, Oxacilina y Vancomicina)
- Agar MRS (Man Rogosa Sharpe) HIMEDIA
- Caldo MRS (Man Rogosa Sharpe) HIMEDIA
- Agar TSA (Agar de Soya Trypticase) HIMEDIA
- Agar nutritivo DIFCO
- Agar agar MERCK
- Agar manitol salado HIMEDIA
- Agar MacConkey HIMEDIA

- Glucosa HIMEDIA
- Lactosa HIMEDIA
- Maltosa HIMEDIA
- Manitol SIGMA
- Manosa SIGMA
- Sorbitol SIGMA
- Arabinosa SIGMA
- Esculina SIGMA

#### **2.2.4. MATERIALES DE CAMPO Y OTROS**

- GPS
- Caja térmica
- Gel refrigerante
- Bolsas de polipropileno estériles
- Termómetro ambiental SPRINGFIELD/HTC-1
- EPPs
- Libreta de campo

#### ***OTROS MATERIALES***

- Filtros de jeringa estériles de 0,20  $\mu$  y 0,45  $\mu$
- Cuchillo y tenedor estériles
- Asas de siembra de 0,1mL
- Mechero bunsen
- Papel craft

- Parafilm
- Pinzas
- Tijeras
- Gradillas
- Ligas
- Plumón marcador
- Papel aluminio
- Tiras indicadoras para control de esterilización 3M
- Gasa
- Envases con tapa hermética
- Cinta adhesiva
- Propipetas
- Micropipetas de 10-100  $\mu\text{L}$  y 100-1000  $\mu\text{L}$
- Tips o puntas estériles (10-100  $\mu\text{L}$  y 100-1000  $\mu\text{L}$ )
- Algodón

## **2.3. METODOLOGÍA**

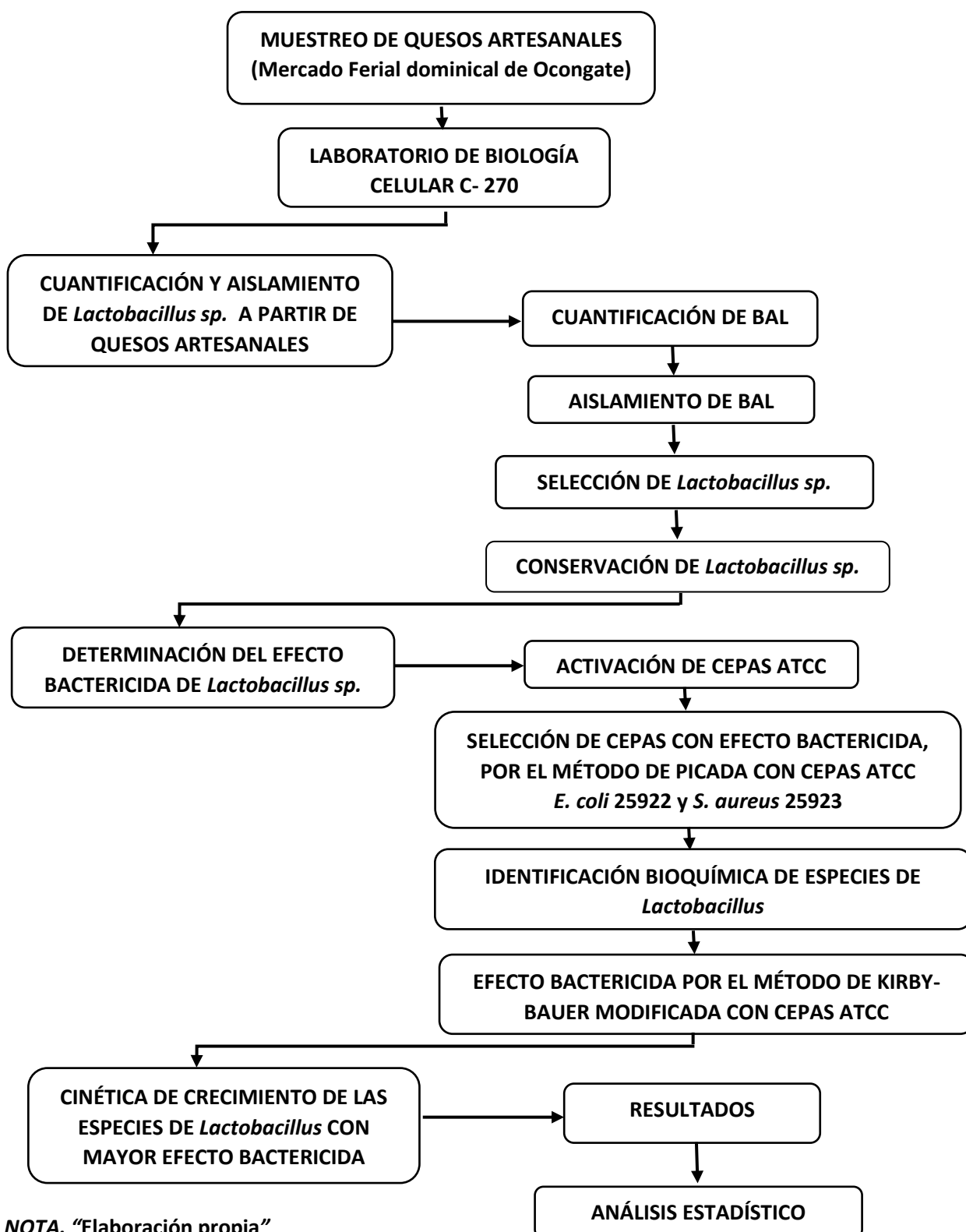
### **2.3.1. Tipo de Investigación**

El presente trabajo de investigación es de tipo transversal y experimental, ya que estudia las variables paralelamente en tiempos establecidos y describe características, diferencias o asociaciones entre las variables y se introdujo y manipuló un factor causal para determinar su efecto y establecer causalidad entre las variables (Pineda & De Alvarado, 2008).

### 2.3.2. Flujograma de la Metodología de Investigación

**Figura 6**

*Flujograma de la metodología de investigación*



NOTA. "Elaboración propia"

### **2.3.3. Muestreo**

Se hizo un muestreo no probabilístico por conveniencia. (Pineda & De Alvarado, 2008) de 30 quesos artesanales adquiridos en el mercado ferial dominical de Ocongate. El muestreo se llevó a cabo durante los meses de enero a marzo del 2022, se muestreo cada 14 días (domingo). En cada muestreo se adquirió 5 quesos, lo que resulto en 10 quesos por mes, haciendo el total de 30 quesos.

### **2.3.4. Criterios de Selección de la Muestra**

Para la selección de la muestra se consideró los siguientes criterios, los cuales se registraron en un formato de muestreo.

Criterios de inclusión:

- Quesos de elaboración artesanal
- Con 1 o 2 días de preparación
- Elaborados con cuajos de alpaca y oveja

Criterios de exclusión:

- Quesos elaborados con enzimas e industrializados.

### **2.3.5. Toma de Muestra**

Se adquirieron quesos artesanales del mercado, seleccionados según los criterios de inclusión preestablecidos. Cada queso se colocó individualmente dentro de bolsas de polipropileno estériles y correctamente codificadas, fueron mantenidas en cadena de frío a 4°C aproximadamente en una caja de tecnopor con geles refrigerantes y se trasportó al laboratorio de Biología Celular C-270 de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional De San Antonio Abad del Cusco (Anexo 1) para su procesamiento inmediato. El muestreo se realizó cada 14 días, durante 3

meses, con 5 quesos muestreados por domingo, lo que resultó en un total de 30 quesos adquiridos. Las muestras provinieron de tres comunidades Jullikunka (n=8), Lawa Lawa (n=9), y Tinke (n=13).

## **2.4. CUANTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE *Lactobacillus sp.* DE QUESOS ARTESANALES**

### **2.4.1. Cuantificación de BAL**

Se empleó la metodología descrita por Churqui, (2020); Cristobal, (2008); Pulido, (2013).

Se tomó 10 gr de la parte central de la muestra, haciendo un corte radial con la ayuda de un cuchillo estéril y se adicionó a 90 mL de agua peptonada y se homogenizó. Luego se realizaron diluciones decimales seriadas, transfiriendo 1 mL a un tubo de ensayo con 9 mL de agua peptonada y siguiendo este procedimiento hasta la dilución  $10^{-7}$ . De cada una de las tres últimas diluciones se tomaron 0,1 mL y se sembraron por diseminación, con la ayuda de una espátula de Drigalsky, sobre la superficie de agar MRS, todas por duplicado, según dilución e incubadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas (Anexo 2).

Finalizado el tiempo de incubación, se realizó el recuento de las placas, para lo cual se escogieron placas que tenían entre 30 – 300 colonias y se multiplicó por el factor de dilución expresado en UFC/gr para determinar la carga bacteriana.

### **2.4.2. Aislamiento de BAL**

Según Churqui, (2020) y Cristobal, (2008).

Se aislaron colonias del cultivo en agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) de las placas que poseían entre 30-300 colonias con las siguientes características:



- Tamaño: 2 – 5 mm de diámetro
- Elevación: convexa
- Borde: entero, regular
- Color: Blanquecina, amarillentas
- Brillo: opacas y sin pigmentación
- Textura: cremosa

Luego se inocularon en caldo MRS (Man, Rogosa and Sharpe) a 37°C +/- 1°C por 48 horas, seguidamente se resembraron por estría en agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe), incubando a 37°C +/- 1°C por 48 horas, con el objetivo de purificar las colonias.

#### **2.4.3. Selección de *Lactobacillus sp.***

Se siguió los pasos descritos en la metodología de Churqui, (2020) y Cristobal, (2008)

Se seleccionaron las colonias catalasa negativos, oxidasa negativos y coloración Gram positivas con morfología de bacilos, se les transfirió a 10 mL de caldo MRS (Man, Rogosa and Sharpe) a 37°C +/- 1°C por 48 horas para estabilizar los aislados (Anexo 3 y 4).

#### **2.4.4. Conservación de *Lactobacillus sp.***

Para la preparación del cepario se tomó una colonia de *Lactobacillus sp.*, se inocularon en TSA y se incubó a 37°C por 24 horas, y se guardaron a 4°C para conservar las características principales de la cepa.

### **2.5. DETERMINACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DE *Lactobacillus sp.* FRENTE A**

***E. coli* ATCC 25922 Y *S. aureus* ATCC 25923**

### **2.5.1. Activación de Cepas ATCC *E. coli* 25922 y *S. aureus* 25923 y Preparación de Escala de Mcfarland 0,5**

Se preparó placas con agar MacConkey para *E. coli* 25922 y agar manitol salado para *S. aureus* 25923, para la activación de las cepas ATCC se siguió los procedimientos descritos en las instrucciones de los dispositivos KWIK-STIK™ adquiridos de la División Microbiología y cultivo celular de la empresa de biotecnología Gen Lab del Perú S.A.C. Seguidamente se prepararon las diluciones en escala Mcfarland 0,5 (Anexo 5).

### **2.5.2. Selección de cepas con efecto bactericida, por el método de picada (Zamora, 2003) y Formación de Halos de Inhibición**

De las cepas obtenidas se seleccionaron 32 cepas, quienes se sometieron a la prueba de potencial antagonista usando la metodología de Galliano y Hinsdill, (1970), como se citó en Martin del Campo et al.,(2008) y Zamora (2003).

Se preparó 2 placas con agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) y se sembraron cada una de las cepas aisladas por picada en grupos de 16 sobre la superficie del agar y se incubó a 30°C x 24 horas. Después se añadió una sobrecapa de 10 mL de agar TSA blando (Anexo 6) con una suspensión de *E. coli* ATCC 25922, correspondiente a la escala de McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  bacterias/ mL) en una proporción 1:9 y se volvió a incubar por 24 horas a 37°C. Luego se procedió a la lectura de la formación de los halos de inhibición y medida del diámetro; el mismo procedimiento se realizó para la cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

Para la interpretación, se consideró resultado positivo los halos más nítidos y con medidas mayores a 1 mm de diámetro.

### 2.5.3 Identificación Bioquímica de *Lactobacillus sp.*

Para la identificación se siguió la metodología descrita por Gusils et al., (2001), como se citó en Pérez et al., (2015) y Cristobal, (2008).

La identificación de las cepas con mayor efecto bactericida en la prueba por método de picada, del género *Lactobacillus sp.*, se ejecutó por medio de la asimilación de carbohidratos tales como: glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, sorbitol, esculina y arabinosa, usando como medio base, caldo peptonado, y rojo de metilo como indicador de producción de ácidos. Cada carbohidrato se preparó con una concentración final del 1%. Adicionalmente se realizaron pruebas de crecimiento a 15°C y 45°C (Anexo 7).

### 2.5.4 Efecto Bactericida de las especies *Lactobacillus sp.* por el Método De Kirby Bauer Modificada Frente a Cepas ATCC *E. coli* 25922 y *S. aureus* 25923

Según Zamora (2003) y Neria (2006).

Se realizó esta prueba, a las especies identificadas y que mostraron halos entre 7-15mm de diámetro del procedimiento anterior, para confirmar su efecto bactericida, para esto, fueron sembradas en 10ml de caldo MRS (Man, Rogosa and Sharpe) e incubadas a 30°C x 18 horas, obteniendo una escala de McFarland 1 ( $3 \times 10^8$  bact/ mL), de este cultivo se tomaron 50 µL y se sembraron en pocillos de 6 mm de diámetro realizados previamente en placas con agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) y se incubó por 24 horas a 30°C. Luego de este tiempo se añadió con cuidado, 10 mL de una sobrecapa de TSA blando con 0,7% de agar, preparadas con 100 µL de la cepa ATCC a escala de Mcfarland de 0,5 y se dejó solidificar. Finalmente se incubó por 24 - 48 horas a 37°C para observar los halos de inhibición; este procedimiento se realizó por triplicado (Anexo 8).

Como control negativo se preparó una placa con agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe), en la cual no se efectuó la inoculación con las cepas ATCC, posteriormente se aplicó los discos con antibióticos, se incubó por 24 - 48 horas a 37°C, en la lectura de los resultados, se observó que en las placas no se generó halos de inhibición debido a que no hubo crecimiento bacteriano.

Para el control positivo se preparó una placa con agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe), luego se añadió 10 mL de una sobrecapa de TSA blando con 0,7% de agar, preparadas con 100 µL de la cepa ATCC a escala de Mcfarland de 0,5 y se dejó solidificar. Luego se colocaron los discos de antibióticos en cada placa; Ampicilina (AM) y Amoxicilina + ácido clavulánico(AMC) para *E. coli* ATCC 25922. Vancomicina (VAN) y Oxacilina (OXA) para *S. aureus* ATCC 25922, se incubó por 24 - 48 horas a 37°C y se midieron los halos de inhibición generados.

### **2.5.5 Cinética de crecimiento de *Lactobacillus* sp. con mayor efecto bactericida**

Se tomaron las especies que poseían espectros inhibitorios más altos, para evaluar sus parámetros cinéticos y compararlos, así entender mejor el comportamiento de diferentes especies de *Lactobacillus* en el mismo medio de cultivo específico, se siguió la metodología descrita por Crueger & Crueger, (1993) como citó Salcedo, (2021) y Jurado & Jarrín, (2015), donde primero se obtuvo precultivos de cada especie, y se inocularon en concentraciones conocidas en caldos MRS y periódicamente se tomaron alícuotas de 1mL para ser leídas en un espectrofotómetro a 600 nm, y realizar la curva de crecimiento (Anexo 9)

## **2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis descriptivo de frecuencias, porcentajes, análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para determinar si hubo diferencia estadística significativa, haciendo uso del paquete estadístico SPSS V.22, con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. MUESTREO DE QUESOS ARTESANALES.

Se muestrearon 30 quesos del mercado ferial de Ocongate, provenientes de 3 comunidades distintas, obteniendo la siguiente distribución de muestras por comunidad.

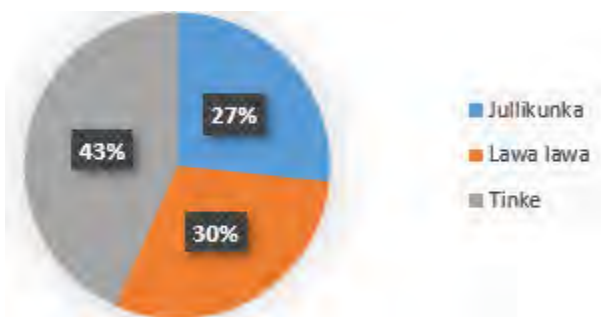
**Tabla 4**

*Procedencia del queso artesanal muestreado*

| Comunidad    | Frecuencia | Porcentaje  |
|--------------|------------|-------------|
| Jullikunka   | 8          | 26,7%       |
| Lawa lawa    | 9          | 30,0%       |
| Tinke        | 13         | 43,3%       |
| <b>Total</b> | <b>30</b>  | <b>100%</b> |

**Figura 7**

*Porcentaje de muestreo de quesos artesanales del mercado ferial provenientes de tres comunidades del distrito de Ocongate.*



De la tabla 4 y fig. 7 se observa que el 43,3% de quesos provienen de la comunidad de Tinke, 30% de Lawa Lawa y 26,7% de Jullikunka, esta distribución estuvo determinada principalmente por la disponibilidad en el mercado ferial durante el periodo de muestreo, lo que puede reflejar el acceso al comercio local y la frecuencia de participación de las comunidades en la feria dominical, siendo la comunidad de Tinke la que concentra mayor proporción de productos.

### 3.2. CUANTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE *Lactobacillus sp. A*

#### PARTIR DE QUESOS ARTESANALES

##### 3.2.1. Cuantificación de BAL

**Tabla 5**

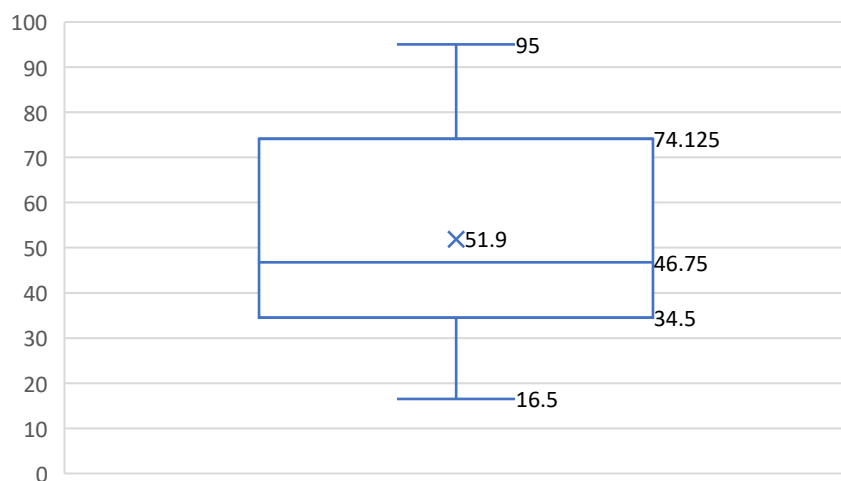
*Promedios del recuento de BAL y tipo de cuajo usado en los quesos artesanales*

| CÓDIGO   | PROMEDIO EN UFC/gr    | PROMEDIO Log10 (UFC/gr) | TIPO DE CUAJO |
|----------|-----------------------|-------------------------|---------------|
| Q1L      | 51x10 <sup>9</sup>    | 10,708                  | Alpaca        |
| Q4L      | 79 x10 <sup>9</sup>   | 10,898                  | Alpaca        |
| Q7L      | 73,5 x10 <sup>9</sup> | 10,866                  | Alpaca        |
| Q8L      | 85 x10 <sup>9</sup>   | 10,929                  | Alpaca        |
| Q10L     | 82,5 x10 <sup>9</sup> | 10,916                  | Alpaca        |
| Q20L     | 21 x10 <sup>9</sup>   | 10,322                  | Alpaca        |
| Q21L     | 48 x10 <sup>9</sup>   | 10,681                  | Alpaca        |
| Q22L     | 45,5 x10 <sup>9</sup> | 10,658                  | Alpaca        |
| Q23L     | 31,5 x10 <sup>9</sup> | 10,498                  | Alpaca        |
| Q2T      | 44 x10 <sup>9</sup>   | 10,643                  | Alpaca        |
| Q3T      | 41 x10 <sup>9</sup>   | 10,613                  | Alpaca        |
| Q5T      | 95 x10 <sup>9</sup>   | 10,978                  | Alpaca        |
| Q6T      | 76 x10 <sup>9</sup>   | 10,881                  | Alpaca        |
| Q9T      | 55,5 x10 <sup>9</sup> | 10,744                  | Alpaca        |
| Q16T     | 67 x10 <sup>9</sup>   | 10,826                  | Alpaca        |
| Q17T     | 35,5 x10 <sup>9</sup> | 10,55                   | Alpaca        |
| Q25T     | 32 x10 <sup>9</sup>   | 10,505                  | Alpaca        |
| Q26T     | 34,5 x10 <sup>9</sup> | 10,538                  | Alpaca        |
| Q27T     | 34,5 x10 <sup>9</sup> | 10,538                  | Alpaca        |
| Q28T     | 34 x10 <sup>9</sup>   | 10,531                  | Alpaca        |
| Q29T     | 94 x10 <sup>9</sup>   | 10,973                  | Alpaca        |
| Q30T     | 36,5 x10 <sup>9</sup> | 10,562                  | Alpaca        |
| Q11J     | 55,5 x10 <sup>9</sup> | 10,744                  | Oveja         |
| Q12J     | 77 x10 <sup>9</sup>   | 10,886                  | Alpaca        |
| Q13J     | 38 x10 <sup>9</sup>   | 10,58                   | Alpaca        |
| Q14J     | 53 x10 <sup>9</sup>   | 10,724                  | Alpaca        |
| Q15J     | 64,5 x10 <sup>9</sup> | 10,81                   | Alpaca        |
| Q18J     | 18 x10 <sup>9</sup>   | 10,255                  | Alpaca        |
| Q19J     | 16,5 x10 <sup>9</sup> | 10,217                  | Oveja         |
| Q24J     | 38 x10 <sup>9</sup>   | 10,58                   | Oveja         |
| Promedio | 51,9 ± 22,52          | -                       | -             |

*NOTA:* El código se asignó de acuerdo con el número de orden de muestra y por su procedencia (Ejm. Q1L: Queso número 1, procedente de la comunidad de Lawa Lawa).

**Figura 8**

*Promedio del recuento de microorganismos ácido-lácticos en UFC/gr*



En la Tabla 5 y Figura 8, los quesos artesanales de uno a dos días de elaboración presentan recuentos de BAL entre  $16,5 - 95 \times 10^9$  UFC/gr con un promedio de  $51,9 \times 10^9$  UFC/gr a diferencia de Peralta (2014), quien en su investigación, a partir de 14 muestras de quesos frescos artesanales (con uno a dos días de elaboración) provenientes de Anta, reportó en promedio un recuento de  $16,07 \times 10^7$  UFC/gr siendo menor al presente estudio, de igual manera Martín del Campo et al. (2008), a partir de 35 muestras de 4 tipos diferentes de quesos (adobero, panela, ranchero y fresco), muestreados en la ciudad de Guadalajara, México, obtuvo en promedio un recuento de  $11,39 \times 10^7$  UFC/gr de BAL, por su parte Churqui (2020), en su investigación, muestreo 27 quesos frescos expendidos en tres mercados de la ciudad de Puno-2017, obteniendo un recuento de  $2,27 \times 10^5$  UFC/gr de bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus sp.*, el cual es inferior a lo reportado en el presente trabajo de investigación.

### 3.2.1.1 Recuento de BAL por tipo de cuajo.

**Tabla 6**

*Recuento en UFC/gr por tipo de cuajo/ANOVA*

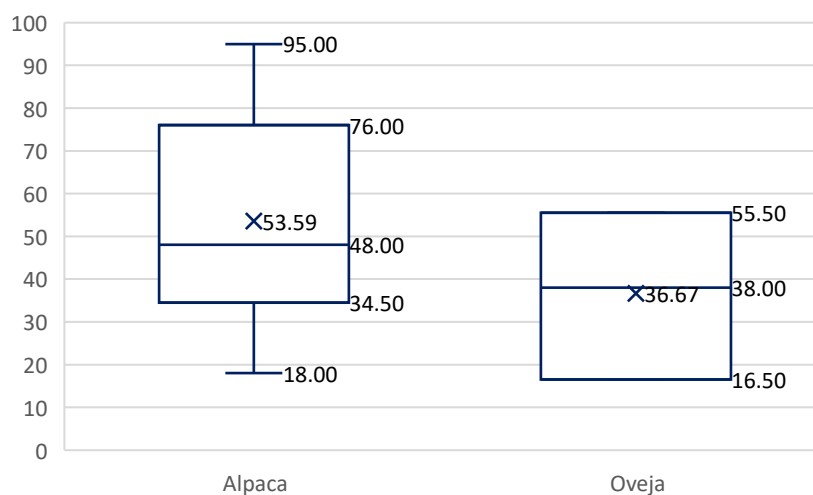
| TIPO DE CUAJO | Variable                | n  | Media | D.E.  | Mín. | Máx. |
|---------------|-------------------------|----|-------|-------|------|------|
| Alpaca        | UFC/gr *10 <sup>9</sup> | 27 | 53,59 | 22,51 | 18   | 95   |
| Oveja         | UFC/gr *10 <sup>9</sup> | 3  | 36,67 | 19,53 | 16,5 | 55,5 |

| F.V.                 | SC       | gl | CM     | F    | p-valor |
|----------------------|----------|----|--------|------|---------|
| <b>Modelo</b>        | 773,51   | 1  | 773,51 | 1,55 | 0,22    |
| <b>Tipo de cuajo</b> | 773,51   | 1  | 773,51 | 1,55 | 0,22    |
| <b>Error</b>         | 13940,19 | 28 | 497,86 |      |         |
| <b>Total</b>         | 14713,7  | 29 |        |      |         |

El p-valor obtenido fue de 0,22 que es superior a 0,05 por consiguiente no existe diferencia significativa en el tipo de cuajo utilizado.

**Figura 9**

*Recuento de BAL en UFC/gr por tipo de cuajo*





De la tabla y figura anterior observamos que según el tipo de cuajo usado en la elaboración de queso artesanal se aprecia un recuento de BAL, que va entre  $18,0 - 95,0 \times 10^9$  UFC/gr con cuajo de alpaca y  $16,5 - 55,5 \times 10^9$  UFC/gr con cuajo de oveja.

### 3.2.1.2 Recuentos de BAL por lugar de procedencia.

**Tabla 7**

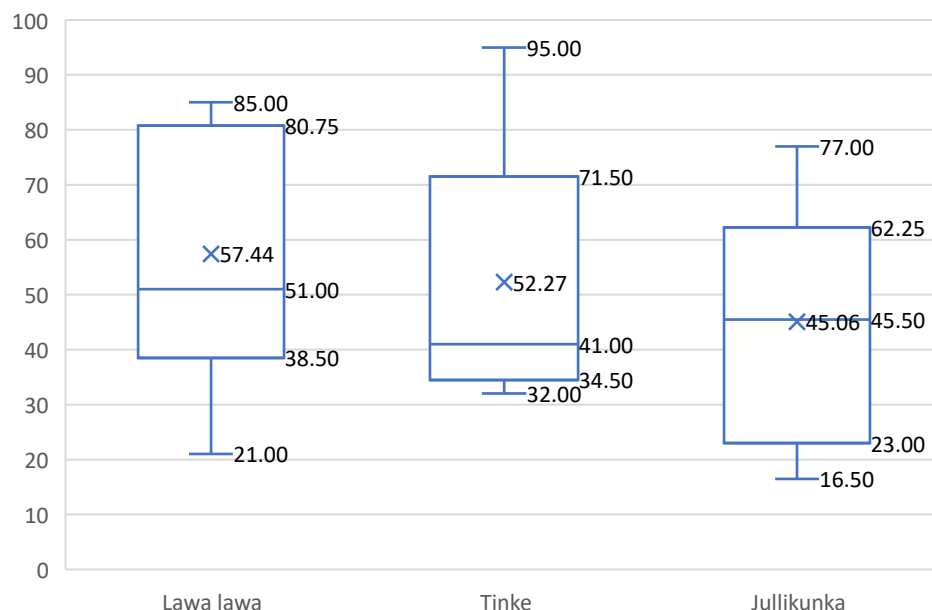
*Promedios de las UFC/gr de  $10^9$  por lugar de procedencia /ANOVA*

| <i>Origen</i>     | <i>Variable</i> | <i>N</i> | <i>Media</i> | <i>D.E.</i> | <i>Mín.</i> | <i>Máx.</i> |
|-------------------|-----------------|----------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Jullikunka</b> | UFC/gr * $10^9$ | 8        | 45,06        | 21,44       | 16,5        | 77          |
| <b>Lawa lawa</b>  | UFC/gr * $10^9$ | 9        | 57,44        | 23,41       | 21          | 85          |
| <b>Tinke</b>      | UFC/gr * $10^9$ | 13       | 52,27        | 23,2        | 32          | 95          |

| <i>F.V.</i>   | <i>SC</i> | <i>gl</i> | <i>CM</i> | <i>F</i> | <i>p-valor</i> |
|---------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| <b>Modelo</b> | 652,45    | 2         | 326,23    | 0,63     | 0,54           |
| <b>origen</b> | 652,45    | 2         | 326,23    | 0,63     | 0,54           |
| <b>Error</b>  | 14061,25  | 27        | 520,79    |          |                |
| <b>Total</b>  | 14713,7   | 29        |           |          |                |

**Figura 10**

*Recuento de BAL en UFC/gr según lugar de procedencia*



De la tabla y figura anterior se observó que, según el lugar de procedencia del queso artesanal fresco, se aprecian recuentos promedios de BAL, de  $45,06 \times 10^9$  UFC/gr de los quesos procedentes de Jullikunka,  $52,27 \times 10^9$  UFC/gr de los quesos procedentes de Tinke y  $57,44 \times 10^9$  UFC/gr de los quesos procedentes de Lawa lawa.

El p-valor obtenido es 0,54 siendo superior a 0,05 lo que indica que no existe diferencia significativa en los recuentos según el lugar de procedencia.

Churqui (2020), en su trabajo de investigación muestreo quesos frescos de tres diferentes mercados en la ciudad de Puno, obteniendo en promedio, recuentos bacterianos de  $2,41 \times 10^5$  UFC/gr en el mercado de Unión y Dignidad,  $1,73 \times 10^5$  UFC/gr en el mercado de Laykakota, y  $2,11 \times 10^5$  UFC/gr en el mercado Central. Al realizar un análisis de varianza, encontró que, si existía diferencia significativa entre ellos, y al realizar una prueba Tukey determinó que los mayores recuentos se

encontraban en los quesos obtenidos del mercado Unión y Dignidad. Churqui sugiere que las condiciones de manipulación y almacenamiento puede influir en la carga bacteriana.

Ambos resultados indican que la calidad inicial del queso, las condiciones de transporte y almacenamiento y las prácticas de higiene en cada mercado podrían influir críticamente, ya que pueden causar desecación del producto, incremento de bacterias patógenas, pH inadecuados, entre otros, disminuyendo así la carga bacteriana de bacterias ácido lácticas. Por el contrario, el lugar u origen del queso no es un factor determinante de la presencia y cantidad de estas bacterias.

### 3.2.2. Aislamiento de BAL

Se aislaron colonias con características propias de BAL, a partir de placas que muestran colonias entre 30-300, de la siguiente manera:

**Tabla 8**

*Número de colonias BAL aisladas, por lugar de procedencia*

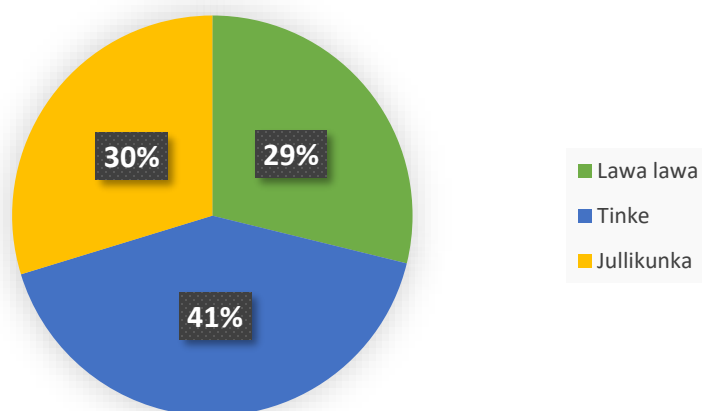
| CÓDIGO | Nº DE COLONIAS AISLADAS<br>POR CADA QUESO |
|--------|---|
| Q1L    | 5   |
| Q4L    | 3   |
| Q7L    | 3   |
| Q8L    | 5   |
| Q10L   | 3   |
| Q20L   | 4   |
| Q21L   | 3   |
| Q22L   | 3   |
| Q23L   | 3   |
| Q2T    | 4   |
| Q3T    | 5   |
| Q5T    | 4   |
| Q6T    | 3   |
| Q9T    | 4   |
| Q16T   | 2   |
| Q17T   | 5   |
| Q25T   | 3   |
| Q26T   | 2   |
| Q27T   | 3   |

| CÓDIGO       | Nº DE COLONIAS AISLADAS<br>POR CADA QUESO |
|--------------|---|
| Q28T         | 3   |
| Q29T         | 4   |
| Q30T         | 4   |
| Q11J         | 3   |
| Q12J         | 4   |
| Q13J         | 6   |
| Q14J         | 4   |
| Q15J         | 4   |
| Q18J         | 2   |
| Q19J         | 3   |
| Q24J         | 7   |
| <b>TOTAL</b> | <b>111</b>                                |

*NOTA:* El código se asignó de acuerdo con el número de orden de muestra y por su procedencia (Ejm. Q1L: Queso número 1, procedente de la comunidad de Lawa Lawa).

### Figura 11

*Porcentaje del número de colonias aisladas de BAL por su procedencia*



Aparicio (2016), en su investigación en la Universidad de Jaén- España, aisló un total de 50 cepas de BAL, a partir de 11 muestras de diferentes tipos de queso, siendo 2 de ellas, cepas pertenecientes a microorganismos Gram negativos. Pulido (2013), aisló 100 cepas a partir de 50 muestras de quesos, los cuales diferenció por la morfología de las colonias, perteneciendo a bacterias ácido lácticas.

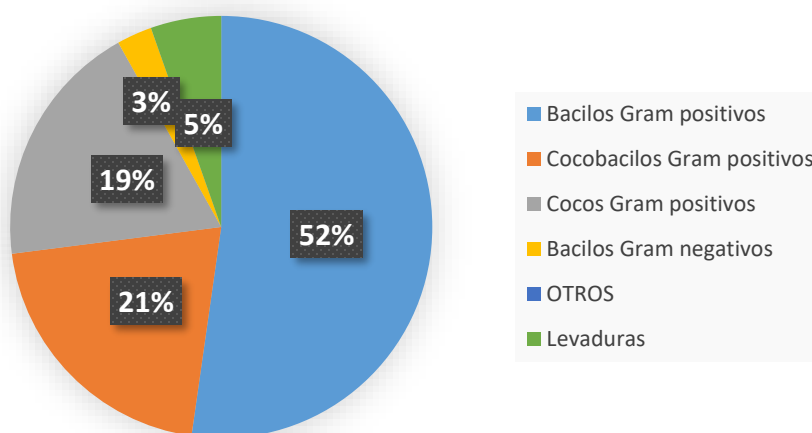
Se seleccionaron 32 cepas Gram positivas con morfología de bacilos.

### 3.2.3. Selección de *Lactobacillus sp.*

Se seleccionaron colonias con características típicas para *Lactobacillus sp.* tales como; tamaño: 2 – 5 mm de diámetro, elevación: convexa, borde: entero, regular, color: blanquecina, amarillentas, brillo: opacas y sin pigmentación, textura: cremosa, catalasa negativa, oxidasa negativa y coloración Gram positivas con morfología de bacilos (Tabla 22, Anexo 3 y 4).

**Figura 12**

*Porcentaje de microorganismos hallados*



De la Figura 12 y Tabla 21 y 22 que se encuentra en el Anexo 4, se observa que el 52% son bacilos Gram positivos, característicos de *Lactobacillus sp.* El 43% pertenecían a otros microorganismos con características similares, pero morfología de Cocobacilos Gram positivos, Cocos Gram positivos y Bacilos Gram negativos y el 5% representa a levaduras.

**Tabla 9***Número de cepas de Lactobacillus sp. aislados y selección de cepas para el efecto bactericida*

| CÓDIGO |        | COLONIAS AISLADAS |        |        |        |        |        | TOTAL |
|--------|--------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| Q1L    | Q1L-A  | Q1L-B             | Q1L-C  | Q1L-D  | Q1L-E  |        |        | 1     |
| Q4L    | Q4L-A  | Q4L-B             | Q4L-C  |        |        |        |        | 1     |
| Q7L    | Q7L-A  | Q7L-B             | Q7L-C  |        |        |        |        | 1     |
| Q8L    | Q8L-A  | Q8L-B             | Q8L-C  | Q8L-D  | Q8L-E  |        |        | 1     |
| Q10L   | Q10L-A | Q10L-B            | Q10L-C |        |        |        |        | 1     |
| Q20L   | Q20L-A | Q20L-B            | Q20L-C | Q20L-D |        |        |        | 1     |
| Q21L   | Q21L-A | Q21L-B            | Q21L-C |        |        |        |        | 1     |
| Q22L   | Q22L-A | Q22L-B            | Q22L-C |        |        |        |        | 1     |
| Q23L   | Q23L-A | Q23L-B            | Q23L-C |        |        |        |        | 1     |
| Q2T    | Q2T-A  | Q2T-B             | Q2T-C  | Q2T-D  |        |        |        | 1     |
| Q3T    | Q3T-A  | Q3T-B             | Q3T-C  | Q3T-D  | Q3T-E  |        |        | 1     |
| Q5T    | Q5T-A  | Q5T-B             | Q5T-C  | Q5T-D  |        |        |        | 1     |
| Q6T    | Q6T-A  | Q6T-B             | Q6T-C  |        |        |        |        | 1     |
| Q9T    | Q9T-A  | Q9T-B             | Q9T-C  | Q9T-D  |        |        |        | 1     |
| Q16T   | Q16T-A | Q16T-B            |        |        |        |        |        | 1     |
| Q17T   | Q17T-A | Q17T-B            | Q17T-C | Q17T-D | Q17T-E |        |        | 1     |
| Q25T   | Q25T-A | Q25T-B            | Q25T-C |        |        |        |        | 1     |
| Q26T   | Q26T-A | Q26T-B            |        |        |        |        |        | 1     |
| Q27T   | Q27T-A | Q27T-B            | Q27T-C |        |        |        |        | 1     |
| Q28T   | Q28T-A | Q28T-B            | Q28T-C |        |        |        |        | 1     |
| Q29T   | Q29T-A | Q29T-B            | Q29T-C | Q29T-D |        |        |        | 1     |
| Q30T   | Q30T-A | Q30T-B            | Q30T-C | Q30T-D |        |        |        | 2     |
| Q11J   | Q11J-A | Q11J-B            | Q11J-C |        |        |        |        | 1     |
| Q12J   | Q12J-A | Q12J-B            | Q12J-C | Q12J-D |        |        |        | 1     |
| Q13J   | Q13J-A | Q13J-B            | Q13J-C | Q13J-D | Q13J-E | Q13J-F |        | 2     |
| Q14J   | Q14J-A | Q14J-B            | Q14J-C | Q14J-D |        |        |        | 1     |
| Q15J   | Q15J-A | Q15J-B            | Q15J-C | Q15J-D |        |        |        | 1     |
| Q18J   | Q18J-A | Q18J-B            |        |        |        |        |        | 1     |
| Q19J   | Q19J-A | Q19J-B            | Q19J-C |        |        |        |        | 1     |
| Q24J   | Q24J-A | Q24J-B            | Q24J-C | Q24J-D | Q24J-E | Q24J-F | Q24J-G | 1     |
| TOTAL  |        |                   |        |        |        |        |        | 32    |

NOTA: El código se asignó de acuerdo con el número de orden de muestra y por su procedencia (Ejm. Q1L: Queso número 1, procedente de la comunidad de Lawa Lawa). Los códigos resaltados de color azul, son las cepas seleccionadas para el efecto bactericida por el método de picada.

### 3.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DE *Lactobacillus sp.*

#### FRENTE A *E. coli* ATCC 25922 Y *S. aureus* ATCC 25923

##### 3.3.1 Selección de Cepas con Efecto Bactericida, por el Método de Picada (Zamora, 2003)

De la lectura de la inhibición nítida y superior a 1mm de diámetro, se tiene:

**Tabla 10**

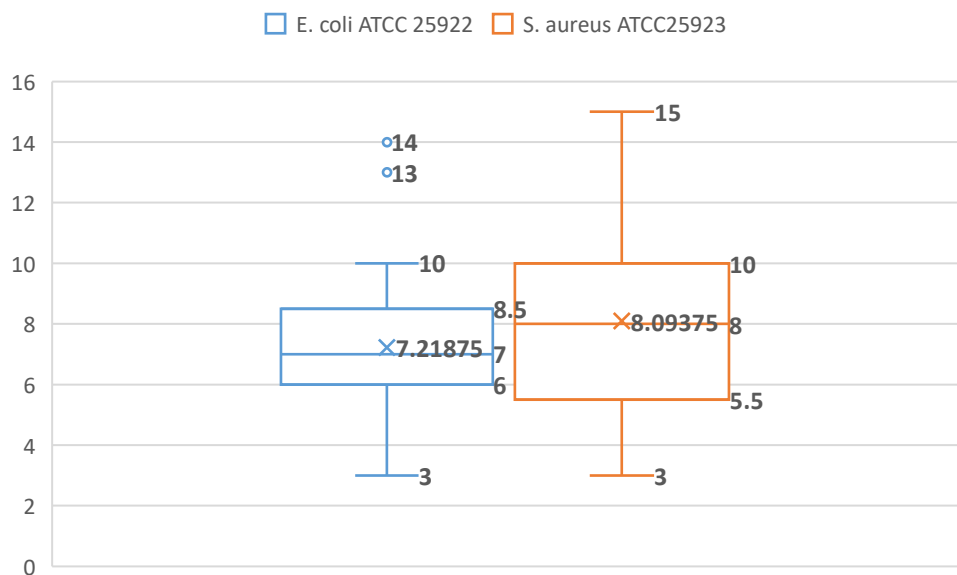
*Halos de inhibición de Lactobacillus sp. frente a E.coli ATCC 25922 y S.aureus ATCC 25923*

| Código                             | DIÁMETRO DE HALO DE INHIBICIÓN EN mm |                  |
|------------------------------------|--------------------------------------|------------------|
|                                    | <i>E. coli</i>                       | <i>S. aureus</i> |
| Q1L-A                              | 9                                    | 10               |
| Q4L-C                              | 10                                   | 8                |
| Q7L-C                              | 7                                    | 10               |
| Q8L-D                              | 5                                    | 6                |
| Q10L-B                             | 10                                   | 8                |
| Q20L-B                             | 5                                    | 5                |
| Q21L-B                             | 6                                    | 5                |
| Q22L-B                             | 6                                    | 7                |
| Q23L-B                             | 3                                    | 6                |
| Q2T-D                              | 9                                    | 7                |
| Q3T-D                              | 6                                    | 3                |
| Q5T-A                              | 9                                    | 7                |
| Q6T-C                              | 8                                    | 9                |
| Q9T-A                              | 13                                   | 15               |
| Q16T-A                             | 4                                    | 7                |
| Q17T-C                             | 7                                    | 8                |
| Q25T-A                             | 7                                    | 5                |
| Q26T-B                             | 5                                    | 5                |
| Q27T-A                             | 5                                    | 8                |
| Q28T-B                             | 7                                    | 12               |
| Q29T-C                             | 7                                    | 10               |
| Q30T-A                             | 8                                    | 14               |
| Q30T-C                             | 14                                   | 15               |
| Q11J-A                             | 7                                    | 10               |
| Q12J-A                             | 7                                    | 5                |
| Q13J-A                             | 4                                    | 7                |
| Q13J-B                             | 6                                    | 4                |
| Q14J-A                             | 6                                    | 8                |
| Q15J-B                             | 7                                    | 5                |
| Q18J-B                             | 7                                    | 9                |
| Q19J-A                             | 9                                    | 9                |
| Q24J-D                             | 8                                    | 12               |
| Promedio del diámetro de los halos | 7.219 ± 2.38                         | 8.094 ± 3.07     |

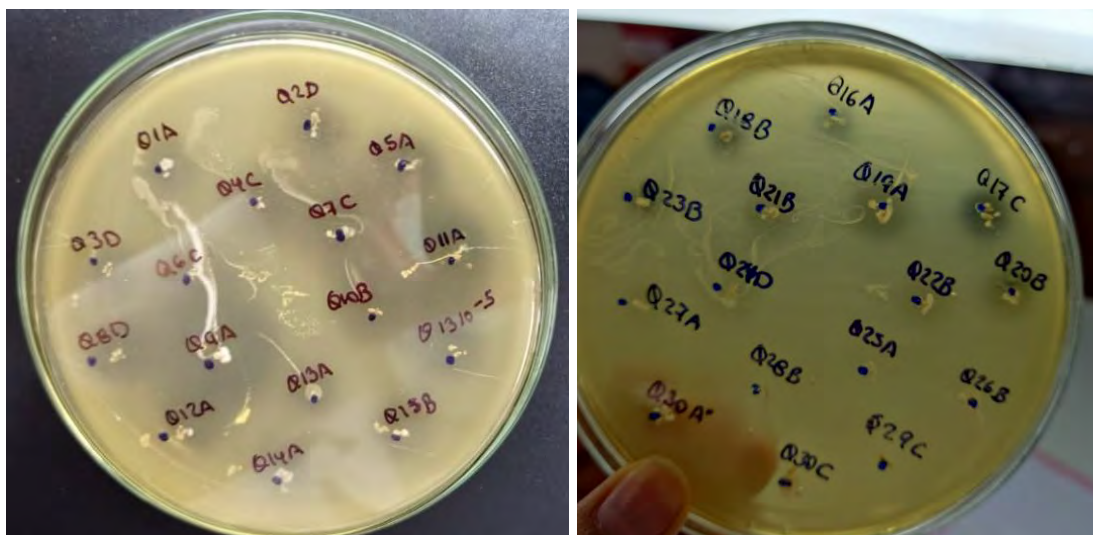
NOTA: El código se asignó de acuerdo con el número de orden de muestra y por su procedencia (Ejm. Q1L: Queso número 1, procedente de la comunidad de Lawa Lawa).

**Figura 13**

*Diámetro del halo generado por las cepas de Lactobacillus sp. frente a E.coli ATCC 25922 y S.aureus ATCC 25923*

**Figura 14**

*Cepas cultivadas por el método de picada y producción de halos*



De la Tabla 10 y Figuras 13 y 14, se observa que el halo de inhibición supera 1mm de diámetro de todas las cepas seleccionadas de *Lactobacillus sp.* Se eligieron 17 cepas con halos de



inhibición entre 7 – 15 mm correspondiente al 53,13% para la identificación bioquímica y confirmar el efecto bactericida por el método de Kirby Bauer frente a *E.coli* ATCC 25922 y *S.aureus* ATCC 25923.

En promedio el diámetro del halo que se creó frente a *E. coli*, después de 24 horas de incubación fue de 7,219 +/- 2,38 mm y para *S. aureus* de 8,094 +/- 3,07 mm, deduciendo así una mejor inhibición frente a *S. aureus* ATCC 25923. Zamora (2003), en su investigación aisló un total de 112 cepas de BAL de sangre de matadero, probando su actividad antagonista frente a cepas de colección y autóctonas por el método de picada, donde el 50% mostró capacidad de inhibición frente a *E. coli* NCTC 5934, y un 25% frente a *S. aureus* NCTC 4163, estos resultados fueron reportados con cruces, teniendo como referencia, medidas entre 2 – 4 mm de diámetro.

### **3.3.2 Identificación Bioquímica de cepas de *Lactobacillus sp.***

Se identificó 4 especies de *Lactobacillus sp.* haciendo uso de pruebas bioquímicas tradicionales.

**Tabla 11***Identificación de Lactobacillus sp.*

| CÓDIGO | CATALASA | OXIDASA | GLUCOSA | LACTOSA | MALTOSA | MANITOL | SORBITOL | XILOSA | ESCULINA | INDOL | PRODUCCIÓN DE GAS | ESPECIE              |
|--------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|--------|----------|-------|-------------------|----------------------|
| Q1L-A  | -        | -       | +       | +       | +       | +       | -        | -      | +        | -     | +                 | <i>L. brevis</i>     |
| Q2T-D  | -        | -       | +       | +       | +       | +       | -        | +      | -        | -     | -                 | <i>L. fermentum</i>  |
| Q4L-C  | -        | -       | +       | +       | +       | +       | -        | +      | +        | -     | +                 | <i>L. brevis</i>     |
| Q5T-A  | -        | -       | +       | +       | +       | -       | -        | +      | -        | -     | -                 | <i>L. fermentum</i>  |
| Q6T-C  | -        | -       | +       | +       | +       | -       | -        | +      | +        | -     | +                 | <i>L. brevis</i>     |
| Q7L-C  | -        | -       | +       | +       | +       | -       | -        | +      | +        | -     | +                 | <i>L. brevis</i>     |
| Q9T-A  | -        | -       | +       | +       | +       | +       | +        | +      | +        | -     | -                 | <i>L. plantarum</i>  |
| Q10L-B | -        | -       | +       | +       | +       | -       | -        | +      | +        | -     | +                 | <i>L. brevis</i>     |
| Q11J-A | -        | -       | +/-     | +       | +       | -       | -        | -      | -        | -     | -                 | <i>L. helveticus</i> |
| Q17T-C | -        | -       | +       | +       | +       | -       | -        | +      | -        | -     | -                 | <i>L. fermentum</i>  |
| Q18J-B | -        | -       | +/-     | +       | +       | -       | -        | +      | +/-      | -     | -                 | <i>L. fermentum</i>  |
| Q19J-A | -        | -       | +       | +       | +       | -       | -        | +      | -        | -     | -                 | <i>L. fermentum</i>  |
| Q24J-D | -        | -       | +       | +       | +       | -       | -        | +      | -        | -     | -                 | <i>L. fermentum</i>  |
| Q28T-B | -        | -       | +/-     | +       | +       | -       | -        | +      | -        | -     | -                 | <i>L. fermentum</i>  |
| Q29T-C | -        | -       | +       | +       | +       | -       | -        | +      | -        | -     | -                 | <i>L. fermentum</i>  |
| Q30T-A | -        | -       | +       | +       | +       | -       | -        | +      | -        | -     | -                 | <i>L. fermentum</i>  |
| Q30T-C | -        | -       | +       | +       | +       | +       | +        | +      | +        | -     | -                 | <i>L. plantarum</i>  |

NOTA: El código se asignó de acuerdo con el número de orden de muestra y por su procedencia (Ejm. Q1L: Queso número 1, procedente de la comunidad de Lawa Lawa).

Las otras características de identificación se presentaron en las siguientes proporciones.

**Tabla 12***Proporciones de identificación bioquímica de especies de Lactobacillus sp.*

| <b>PRUEBAS BIOQUÍMICAS</b> | <b>Resultado</b> | <b>Frecuencia</b> | <b>Porcentaje</b> |
|----------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| <b>CATALASA</b>            | +                | 0                 | <b>0%</b>         |
|                            | -                | 17                | <b>100%</b>       |
| <b>OXIDASA</b>             | +                | 0                 | <b>0%</b>         |
|                            | -                | 17                | <b>100%</b>       |
| <b>GLUCOSA</b>             | +                | 14                | <b>82%</b>        |
|                            | +/-              | 3                 | <b>18%</b>        |
| <b>LACTOSA</b>             | +                | 17                | <b>100%</b>       |
|                            | -                | 0                 | <b>0%</b>         |
| <b>MALTOSA</b>             | +                | 17                | <b>100%</b>       |
|                            | -                | 0                 | <b>0%</b>         |
| <b>MANITOL</b>             | +                | 5                 | <b>29%</b>        |
|                            | -                | 12                | <b>71%</b>        |
| <b>SORBITOL</b>            | +                | 2                 | <b>12%</b>        |
|                            | -                | 15                | <b>88%</b>        |
| <b>XILOSA</b>              | +                | 15                | <b>88%</b>        |
|                            | -                | 2                 | <b>12%</b>        |
| <b>ESCULINA</b>            | +                | 7                 | <b>41%</b>        |
|                            | -                | 9                 | <b>53%</b>        |
|                            | +/-              | 1                 | <b>6%</b>         |
| <b>INDOL</b>               | +                | 0                 | <b>0%</b>         |
|                            | -                | 17                | <b>100%</b>       |
| <b>PRODUCCIÓN DE GAS</b>   | +                | 5                 | <b>29%</b>        |
|                            | -                | 12                | <b>71%</b>        |
| <b>MOTILIDAD</b>           | +                | 0                 | <b>0%</b>         |
|                            | -                | 17                | <b>100%</b>       |

**Tabla 13**

*Otras pruebas adicionales para la identificación.*

| Pruebas adicionales para la identificación | Resultado | Frecuencia | Porcentaje |
|--|-----------|------------|------------|
| Motilidad                                  | +         | 0          | 0%         |
|  | -         | 17         | 100%       |
| Crecimiento a 45 °C                        | +         | 6          | 35%        |
|  | -         | 11         | 65%        |
| Crecimiento a 15 °C                        | +         | 17         | 100%       |
|  | -         | 0          | 0%         |

De la tabla 11, 12 y 13 podemos observar que el 100% de las 17 muestra son:

- Negativas a catalasa, oxidasa, indol y motilidad
- Positivas a lactosa, maltosa y crecimiento a 15°C

Estas pruebas y características permitieron determinar 4 especies de *Lactobacillus sp.* tal como se muestra a continuación:

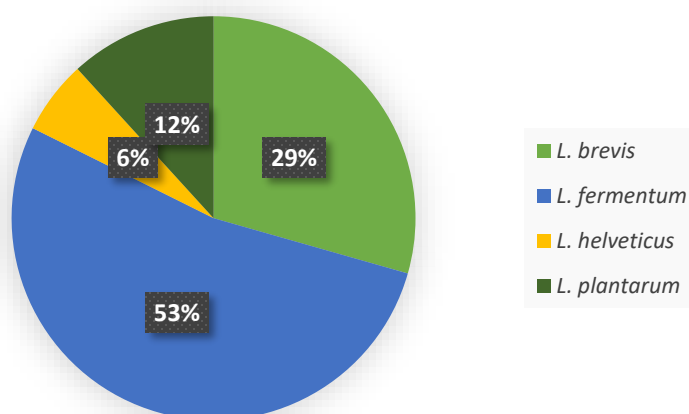
**Tabla 14**

*Porcentaje de especies de Lactobacillus sp. identificados por pruebas bioquímicas.*

| Especie              | Frecuencia | Porcentaje |
|----------------------|------------|------------|
| <i>L. brevis</i>     | 5          | 29%        |
| <i>L. fermentum</i>  | 9          | 53%        |
| <i>L. helveticus</i> | 1          | 6%         |
| <i>L. plantarum</i>  | 2          | 12%        |

**Figura 15**

*Porcentaje de especies identificadas de Lactobacillus sp.*



De la Tabla 14 y Figura 15 se puede deducir que la cepa más frecuente es *L. fermentum* representando el 53%, seguido de *L. brevis* 29%, *L. plantarum* con 12% y *L. helveticus* con 6%.

Gandolfo (2021), Aisló 61 cepas de *Lactobacillus*, a partir de 22 variedades de quesos regionales de diferentes localidades del Perú, identificó por medio de asimilación de carbohidratos (arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, melibiosa, rafinosa, sacarosa, ribosa y xilosa ) 21 cepas correspondientes a *Lactobacillus casei* (34%), 16 a *Lactobacillus plantarum* (26%), 6 a *Lactobacillus delbrueckii* (10%), 5 a *Lactobacillus brevis* (8%), y 4 a *Lactobacillus helveticus* (7%). Por otra parte, 9 cepas (15%) no pudieron ser identificadas debido a que presentaron un comportamiento bioquímico atípico, por ello los clasificó como *Lactobacillus sp.* Sumado a todo el proceso evaluó también propiedades fisiológicas y bioquímicas por medio de la hidrólisis de la arginina, evaluación del crecimiento a temperaturas de 15°C y 45°C, producción de acetil-metil carbinol, pruebas adicionales de crecimiento en caldo nutritivo a temperaturas de 37°C, 45°C y 60°C, evaluación del crecimiento en caldo nutritivo ajustado a pH 7.0 y 9.6, crecimiento en presencia de NaCl al 4% y 6.5% y crecimiento en Agar MRS (pH 6.5),

Agar nutritivo (pH 7.0) y Agar Bilis Esculina (pH 7.0), incubados a 30°C y 37°C en condiciones de microaerofilia y aerofilia, respectivamente. En el presente trabajo de investigación hubo coincidencia con las especies aisladas de *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* y *L. helveticus*, siendo este último el que coincidió también en frecuencia hallada en ambos trabajos de investigación.

Ramirez (2010), realizó la identificación bioquímica de Lactobacilos por medio de pruebas de azúcares fermentables tales como trealosa, melobiosa, rhamnosa y lactosa, por medio de la técnica de microplaca con rojo de fenol como indicador, además de pruebas como catalasa y oxidasa, obteniendo como resultado que las cepas aisladas podrían pertenecer a especies como *Lactobacillus plantarum*, *L. salivarius*, *L. delbrueckii* y *L. acidophilus*, pero debido a las similitudes fenotípicas y fisiológicas entre ellas, el investigador recomienda el uso de técnicas moleculares para una identificación precisa. La única especie que coincidió con el presente trabajo de investigación fue *L. plantarum*.

Cristóbal (2008), identificó las especies *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. fermentum*, *L. helveticus* y *L. brevis*, siendo los de mayor porcentaje, *L. casei* con 56% y *L. plantarum* en un 35,8%, todos aislados a partir de 33 muestras de quesos e identificados por tinción Gram, coloración de esporas, catalasa, oxidasa, motilidad, Voges-Proskauer, hidrolisis de arginina y asimilación de carbohidratos (arabinosa, esculina, fructosa, galactosa, glucosa, inositol, lactosa, maltosa, manitol, melibiosa, rafinosa, sacarosa, salicina, sorbitol y xilosa). En el presente estudio, las especies más comunes fueron *L. fermentum* (53%) y *L. brevis* (29%), es importante destacar que todas las especies aisladas en este trabajo coinciden con las aisladas en la investigación realizada por Cristóbal.

Igualmente Peralta, (2014), en su investigación aisló 75 cepas de bacterias ácido lácticas a partir de 14 muestras de queso fresco, utilizando medio de cultivo MRS, de las cuales 10 cepas

fueron identificadas como *L. plantarum* (5), *L. brevis* (2), *L. pentosus* (2) y *L. lactis spp. Lactis* (1), por medio del sistema API 50CHL, hubo coincidencia de las especies halladas como *L. plantarum* y *L. brevis*, presentándose este último en la misma frecuencia como en el trabajo de Peralta.

Al comparar los diferentes estudios de investigación, se observan coincidencias y posibles diferencias que podrían atribuirse al origen y tipo de muestra, tamaño de la muestra o incluso la metodología usada para la identificación de las especies.

### **3.3.3 Efecto bactericida por el método de Kirby Bauer modificada frente a *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923**

Se utilizó el método modificado de Kirby Bauer para determinar el efecto bactericida frente *E. coli* y *S. aureus*, y llevar a cabo las mediciones de los diámetros de los halos a las 24 horas.

Para la muestra de control positivo, se utilizó los antibióticos, Ampicilina (AM) y Amoxicilina + ácido clavulánico (AMC) para *E.coli* y Oxacilina (OXA) y Vancomicina (VAN) para *S. aureus*.

Tabla 15

*Halos de inhibición de las especies de Lactobacillus frente a E.coli ATCC 25922 y S.aureus ATCC 25923*

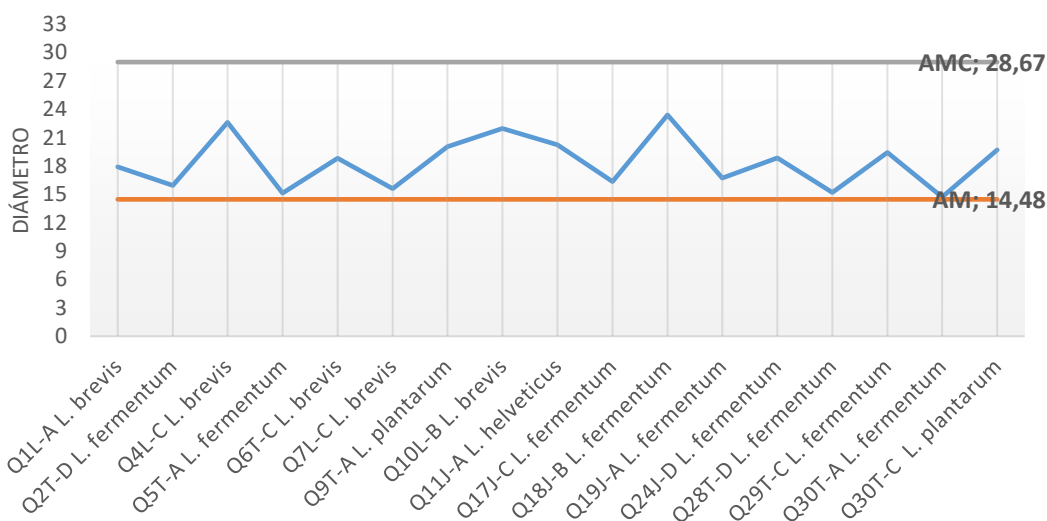
| CÓDIGO/<br>ESPECIE             | HALOS DE INHIBICIÓN EN mm |       |       |          |                             |       |       |          |
|--------------------------------|---------------------------|-------|-------|----------|-----------------------------|-------|-------|----------|
|                                | <i>E. coli</i> ATCC 25922 |       |       |          | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 |       |       |          |
|                                | REPETICIONES              |       |       | PROMEDIO | REPETICIONES                |       |       | PROMEDIO |
|                                | 1º                        | 2º    | 3º    |          | 1º                          | 2º    | 3º    |          |
| Q1L-A<br><i>L. brevis</i>      | 17,52                     | 17,5  | 18,7  | 17,91    | 20,01                       | 21,5  | 23,02 | 21,51    |
| Q2T-D<br><i>L. fermentum</i>   | 15,3                      | 15,82 | 16,7  | 15,94    | 14,55                       | 15,24 | 16,02 | 15,27    |
| Q4L-C<br><i>L. brevis</i>      | 22,2                      | 22,42 | 23,28 | 22,63    | 20,45                       | 22,04 | 25,17 | 22,55    |
| Q5T-A<br><i>L. fermentum</i>   | 14,36                     | 14,78 | 16,24 | 15,13    | 13,22                       | 14,03 | 15,1  | 14,12    |
| Q6T-C<br><i>L. brevis</i>      | 17,05                     | 19,1  | 20,31 | 18,82    | 20,13                       | 22,25 | 24,02 | 22,13    |
| Q7L-C<br><i>L. brevis</i>      | 14,45                     | 15,69 | 16,7  | 15,61    | 18,46                       | 19,35 | 20,27 | 19,36    |
| Q9T-A<br><i>L. plantarum</i>   | 19,64                     | 20,06 | 20,48 | 20,06    | 24,22                       | 25,28 | 27,19 | 25,56    |
| Q10L-B<br><i>L. brevis</i>     | 20,07                     | 22,79 | 23,03 | 21,96    | 18,05                       | 20,11 | 20,17 | 19,44    |
| Q11J-A<br><i>L. helveticus</i> | 17,9                      | 20,48 | 22,36 | 20,25    | 20,89                       | 20,92 | 22,34 | 21,38    |
| Q17J-C<br><i>L. fermentum</i>  | 15,8                      | 16,42 | 16,87 | 16,36    | 19,17                       | 20,24 | 21,38 | 20,26    |
| Q18J-B<br><i>L. fermentum</i>  | 23,04                     | 23,15 | 24,05 | 23,41    | 22,03                       | 25,24 | 28,08 | 25,12    |
| Q19J-A<br><i>L. fermentum</i>  | 15,07                     | 15,12 | 20,01 | 16,73    | 25,95                       | 28,21 | 36,01 | 30,06    |
| Q24J-D<br><i>L. fermentum</i>  | 18,59                     | 18,77 | 19,25 | 18,87    | 23,02                       | 23,13 | 25,23 | 23,79    |
| Q28T-D<br><i>L. fermentum</i>  | 14,75                     | 14,97 | 15,85 | 15,19    | 17,05                       | 18,21 | 18,11 | 17,79    |
| Q29T-C<br><i>L. fermentum</i>  | 18,1                      | 20,03 | 20,16 | 19,43    | 21,02                       | 22,14 | 23,22 | 22,13    |
| Q30T-A<br><i>L. fermentum</i>  | 14,03                     | 14,45 | 15,69 | 14,72    | 20,11                       | 21,44 | 23,24 | 21,59    |
| Q30T-C<br><i>L. plantarum</i>  | 18,58                     | 20,23 | 20,33 | 19,71    | 24,31                       | 25,28 | 26,54 | 25,38    |
| AM                             | 13,34                     | 13,58 | 16,52 | 14,48    | -                           | -     | -     | -        |
| OXA                            | -                         | -     | -     | -        | 45,3                        | 46,33 | 46,57 | 46,07    |
| AMC                            | 28,00                     | 29,00 | 29,00 | 28,67    | -                           | -     | -     | -        |
| VAN                            | -                         | -     | -     | -        | 20,00                       | 21,00 | 20,00 | 20,33    |

NOTA: El código se asignó de acuerdo con el número de orden de muestra y por su procedencia (Ejm. Q1L: Queso número 1, procedente de la comunidad de Lawa Lawa).

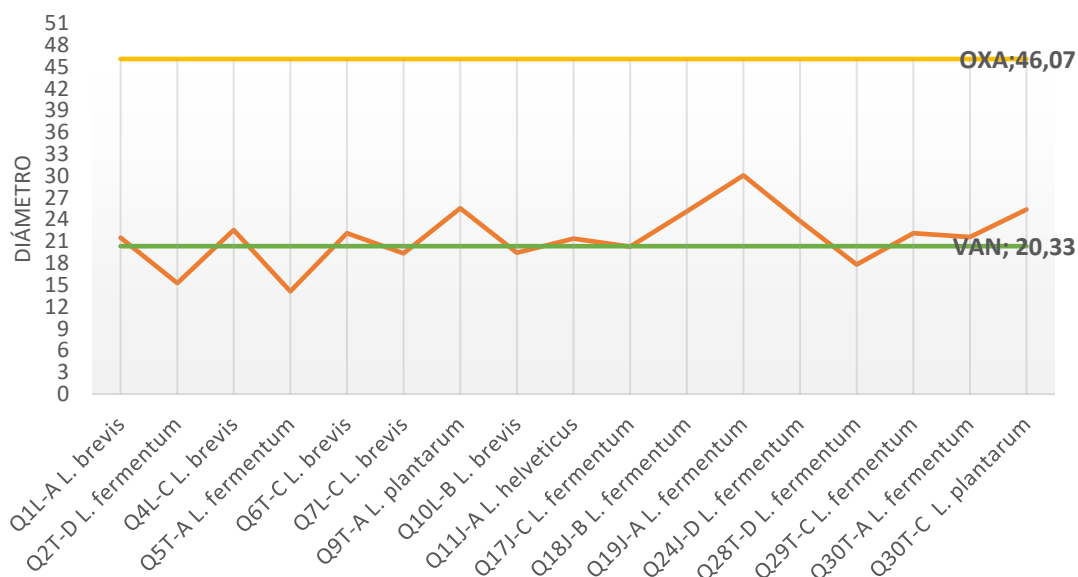


**Figura 16**

*Promedio de diámetros de los halos de inhibición generados, frente a E. coli ATCC 25922.*

**Figura 17**

*Promedio de las medidas de los diámetros de los halos generados frente a S. aureus ATCC 25923.*



Como se observa en la Tabla 15 y Figuras 16 y 17, el halo de mayor diámetro para *E. coli* ATCC 25922 fue de 23,41 mm, y para *S. aureus* ATCC 25923, fue de 30,06 mm; en comparación

con los antibióticos usados como controles positivos, quienes tienen un diámetro de 14,48 mm con AM y 29 mm con AMC para *E. coli* y 46,07 mm con OXA y 20 mm con VAN para *S. aureus*.

Se midieron los halos generados y se realizó prueba de ANOVA y prueba Tukey para la verificación del efecto bactericida de los *Lactobacillus sp.*

### 3.3.3.1 Halo generado por tratamiento de *Lactobacillus sp.* frente a *E. coli* ATCC25922

**Tabla 16**

*ANOVA y prueba Tukey para el diámetro de los halos de inhibición generados por Lactobacillus sp. frente a E. coli ATCC25922*

| F.V.               | SC     | gl | CM    | F     | p-valor |
|--------------------|--------|----|-------|-------|---------|
| <b>Modelo</b>      | 429,04 | 5  | 85,81 | 12,38 | <0,0001 |
| <b>tratamiento</b> | 429,04 | 5  | 85,25 | 12,38 | <0,0001 |
| <b>Error</b>       | 348,41 | 51 | 6,88  |       |         |
| <b>Total</b>       | 777,46 | 56 |       |       |         |

Nota: R cuadrado = 0,55

| Tratamiento                 | Medias | n  | E.E. | Columna5 | Columna6 | Columna7 |
|-----------------------------|--------|----|------|----------|----------|----------|
| <b>AM</b>                   | 14,48  | 3  | 1,52 | A        |          |          |
| <b><i>L. fermentum</i></b>  | 17,31  | 27 | 0,51 | A        | B        |          |
| <b><i>L. brevis</i></b>     | 19,39  | 15 | 0,68 | A        | B        |          |
| <b><i>L. plantarum</i></b>  | 19,89  | 6  | 1,07 |          | B        |          |
| <b><i>L. helveticus</i></b> | 20,25  | 3  | 1,52 |          | B        |          |
| <b>AMC</b>                  | 28,67  | 3  | 1,52 |          |          | C        |

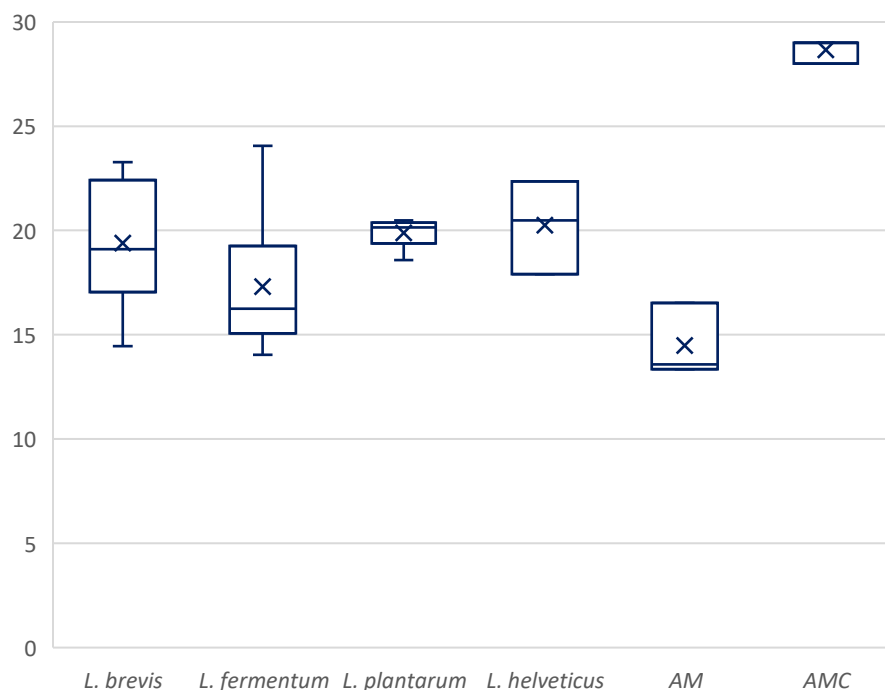
De la tabla anterior se observa que presenta un nivel de significancia de  $<0,0001$  lo que indica que existe diferencia en la medida del diámetro del halo generado por las especies de *Lactobacillus sp.* frente a *E. coli* ATCC25922 con un  $R^2=0,55$ .

La prueba Tukey nos permitió determinar que *L. plantarum* y *L. helveticus* (grupo B) generaron halos significativamente mayores en comparación con AM. Por otro lado, *L. fermentum* y *L. brevis*, no mostraron diferencias significativas frente a AM (grupo A). El grupo C, correspondiente a AMC, se diferenció estadísticamente de los demás, mostrando un mayor halo de inhibición.

En el trabajo de investigación de Churqui, (2020), *E. coli* presentó un promedio de halo de 12.33 mm con respecto a *Lactobacillus sp.* representando un 73,96% de inhibición; al usar gentamicina como antibiótico, obtuvo un promedio de halo de 16,67 mm, con un rango de 15-18 mm, en nuestro trabajo de investigación usamos dos antibióticos, obteniendo como promedio halos de 14,48 y 28,67 para AM y AMC respectivamente, y para el caso de *E. coli* frente a *Lactobacillus sp.* se obtuvo un promedio de 19,21 mm de diámetro en promedio, siendo en este caso, mayor al del estudio de Churqui (2020).

**Figura 18**

*Halo generado por tratamiento de Lactobacillus sp. frente a E. coli*



En la figura anterior podemos observar claramente que el efecto de la AM es inferior a la de las especies de *Lactobacillus sp.*, pero el efecto de AMC es superior. *Lactobacillus brevis* y *L. helveticus* presentaron medianas altas; *L. brevis* evidencio una mayor dispersión, que indica mayor variabilidad. *L. plantarum* presentó medidas más homogéneas, exponiendo un efecto moderado y *L. fermentum* presentó mayor dispersión con una mediana inferior.

Se observa que la especie *L. helveticus* posee un halo de diámetro más grande y la especie *L. fermentum* menor diámetro.

La medida promedio del halo generado por la Ampicilina a las 24 horas fue de 14,48 mm, de Amoxicilina + ácido clavulánico 28,67 mm y de *L. helveticus* 20,25 mm de diámetro.

En la investigación de García, (2016) se menciona que según la escala cualitativa de Durafford, la escala límite de sensibilidad positiva, es mayor o igual a 8 mm, entonces podemos considerar que todas nuestras especies aisladas, poseen sensibilidad positiva frente a *E. coli* ATCC25922.

### 3.3.3.2 Halo generado por tratamiento de *Lactobacillus sp.* frente a *S. aureus* ATCC25923

**Tabla 17**

*ANOVA y prueba Tukey para el diámetro de los halos generados por Lactobacillus sp. frente a S.aureus ATCC 25923*

| <b>F.V.</b>        | <b>SC</b> | <b>gl</b> | <b>CM</b> | <b>F</b> | <b>p-valor</b> |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| <b>Modelo</b>      | 1815,29   | 5         | 363,06    | 24,55    | <0,0001        |
| <b>Tratamiento</b> | 1815,29   | 5         | 363,06    | 24,55    | <0,0001        |
| <b>Error</b>       | 754,03    | 51        | 14,78     |          |                |
| <b>Total</b>       | 2569,32   | 56        |           |          |                |

Nota: R cuadrado = 0,71

| <b>Tratamiento</b>   | <b>Medias</b> | <b>n</b> | <b>E.E.</b> | <b>Columna5</b> | <b>Columna6</b> |
|----------------------|---------------|----------|-------------|-----------------|-----------------|
| <b>VAN</b>           | 20,33         | 3        | 2,22        | A               |                 |
| <i>L. brevis</i>     | 21,00         | 15       | 0,99        | A               |                 |
| <i>L. fermentum</i>  | 21,13         | 27       | 0,74        | A               |                 |
| <i>L. helveticus</i> | 21,38         | 3        | 2,22        | A               |                 |
| <i>L. plantarum</i>  | 25,47         | 6        | 1,57        | A               |                 |
| <b>OXA</b>           | 46,07         | 3        | 2,22        |                 | B               |

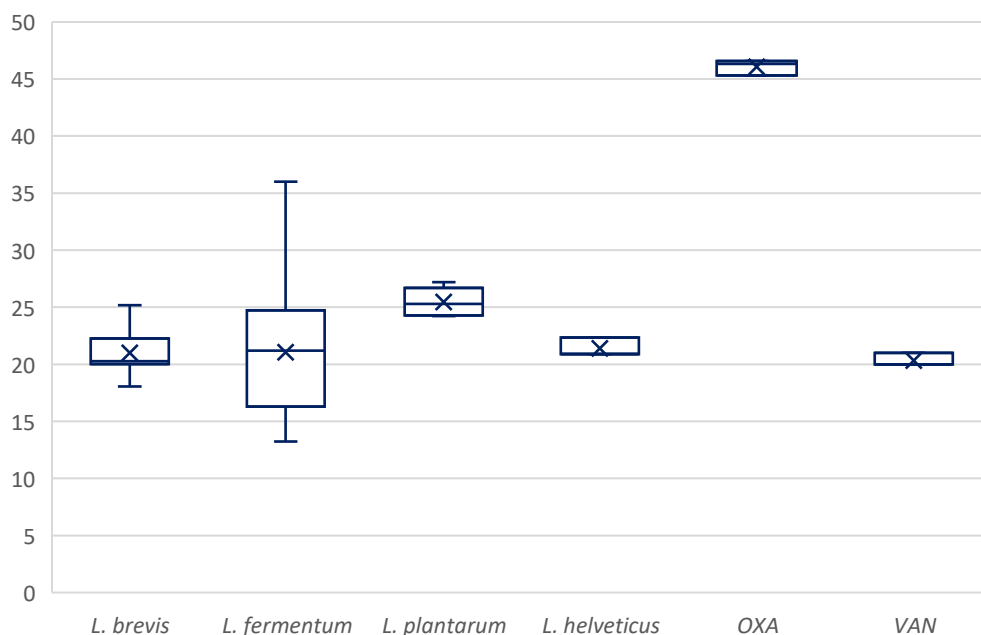
La prueba de ANOVA con sig. muy cercanos a 0 indican que existe diferencias estadísticamente significativas en el halo generado por las especies de *Lactobacillus sp.* con  $R^2=0,71$ . Sin embargo, la prueba Tukey indica que ninguna de las cepas de *Lactobacillus*, presentó diferencias significativas entre sí y VAN, ubicándolos en el grupo A; en cambio la oxacilina presentó un halo significativamente superior, dándole la denominación de grupo B.

Se observa que el halo generado por la Oxacilina es superior a todos los tratamientos, generando halos de 46,07 mm en promedio. *L.plantarum* fue la especie que generó mayor diámetro de halo con 25,47 mm y el de menor diámetro, *L. brevis* con 21 mm. No obstante, podemos manifestar que de acuerdo con la escala cualitativa de Durafford, las cuatro especies aisladas, poseen sensibilidad positiva frente a *S. aureus* ATCC25923.

Según Churqui, (2020), *S. aureus* resulto ser sensible a Gentamicina obteniendo en promedio, un halo de 25 mm, y un rango de 22-28 mm, y frente a *Lactobacillus sp.* Halo promedio de 24,33 mm que en términos de porcentaje es igual a 97,32%, trabajo de investigación que tiene cierto parecido a la prueba que realizamos frente a VAN, que tuvo un halo de 20,33 mm en promedio, no siendo de la misma forma con la OXA que tuvo un mayor espectro de 46,07 mm en promedio. Además, obtuvimos en promedio un halo de 22,23 mm de diámetro frente a *Lactobacillus sp.*, coincidiendo con el trabajo de Churqui, (2020).

**Figura 19**

*Halo generado por tratamiento de Lactobacillus sp. frente a S. aureus ATCC 25923*



Todas las especies presentaron sensibilidad positiva, con halos superiores a 8 mm, es decir, sí presentaron efecto bactericida. *L. plantarum* generó halos de mayor diámetro frente a *S. aureus*.

### 3.3.3.3 Efecto bactericida del *Lactobacillus sp.* frente a *E. coli* ATCC 25922

Cuando los halos son superiores a 8 mm se considera que poseen sensibilidad positiva. El presente trabajo de investigación busca identificar si se presenta efecto bactericida, para lo cual se hizo uso de la prueba de diferencia de medias con  $\mu > 8$  mm, para lo que se planteó la siguiente hipótesis:

**$H_0$ : promedio del halo generado por *Lactobacillus sp.*  $\leq 8$**

**$H_1$ : promedio del halo generado por *Lactobacillus sp.*  $> 8$**

**Tabla 18**

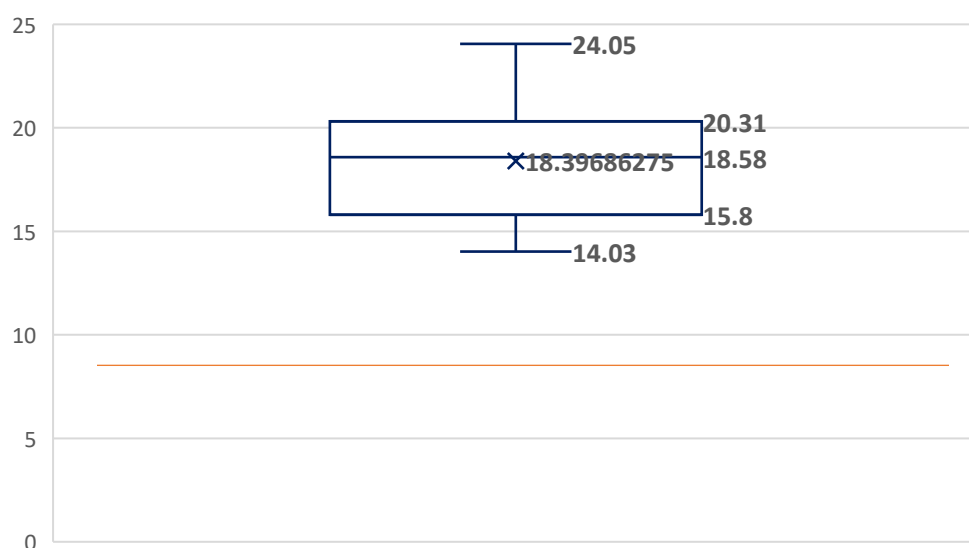
*Efecto bactericida del Lactobacillus sp. frente a E. coli*

| Tiempo   | Media | Desv. | T calculado | Sig.    |
|----------|-------|-------|-------------|---------|
| 24 horas | 18,40 | 2,88  | 25,78       | <0,0001 |

En la Tabla 18 y Figura 20. Transcurridos las 24 horas *Lactobacillus sp.* generó un halo con un promedio de 18,40 mm que es superior a 8 mm, el resultado tuvo significancia, en la prueba t diferencia de medias, por ende, se considera que hay efecto bactericida.

**Figura 20**

*Efecto bactericida del Lactobacillus sp. frente a E. coli. ATCC 25922*



### 3.3.3.4 Efecto bactericida del *Lactobacillus sp.* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Cuando los halos son superiores a 8 mm se considera que poseen sensibilidad positiva. El presente trabajo de investigación busca identificar si se presenta efecto bactericida, para lo cual se hizo uso de la prueba de diferencia de medias con  $\mu > 8$  mm, para lo que se planteó la siguiente hipótesis:



**H<sub>0</sub>: promedio del halo generado por *Lactobacillus sp.*  $\leq 8$**

**H<sub>1</sub>: promedio del halo generado por *Lactobacillus sp.*  $> 8$**

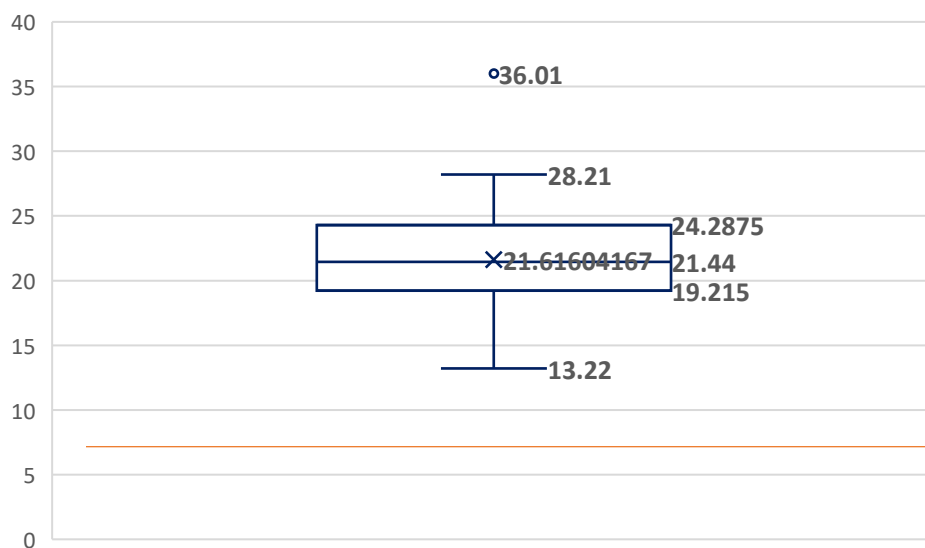
**Tabla 19**

*Efecto bactericida del Lactobacillus sp. frente a S. aureus*

| Tiempo   | Media | Desv. | T calculado | Sig.    |
|----------|-------|-------|-------------|---------|
| 24 horas | 21,62 | 4,25  | 22,20       | <0,0001 |

**Figura 21**

*Efecto bactericida del Lactobacillus sp. frente a Staphylococcus aureus*



De la Tabla 19 y Figura 21, el tamaño del halo generado por los *Lactobacillus sp.* frente a *S. aureus* se observa que es superior a los 8 mm.

Con lo cual queda verificado que la significancia (0,05), es superior a 0,0001 en la prueba t diferencia de medias, por ende, se considera que hay efecto bactericida.

En el trabajo de investigación el tamaño del halo generado presenta significancia y coincide con el trabajo realizado por Churqui, (2020), donde afirma que *Lactobacillus sp.* presenta sensibilidad frente a *E coli* y *S aureus*, presentando diámetros de 12 – 24 mm.

### 3.3.4. Caracterización de *Lactobacillus sp.* con mayor Efecto Bactericida

#### 3.3.4.1 Cinética de crecimiento.

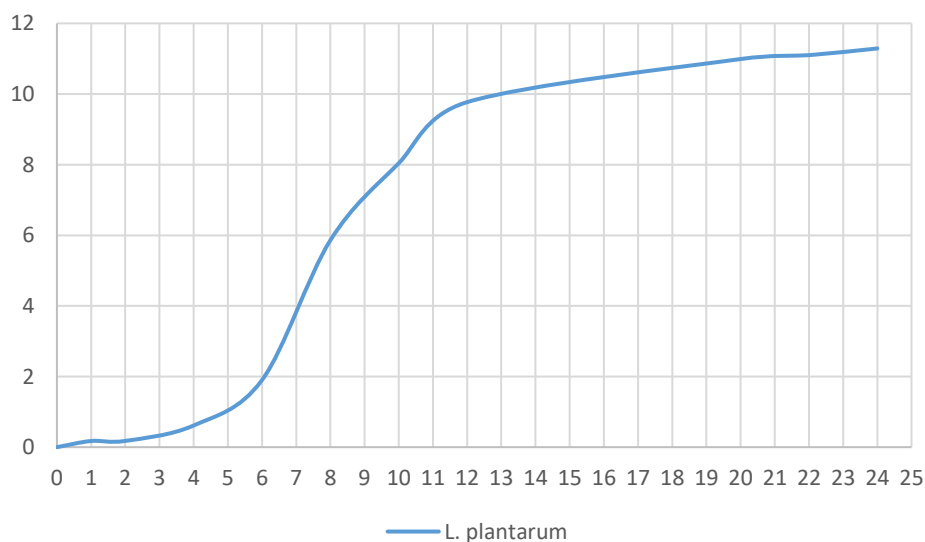
**Tabla 20**

*Datos de absorbancias y tiempos*

| <b>Tiempo<br/>(Horas)</b> | <b><i>L. plantarum</i></b> | <b><i>L. fermentum</i></b> | <b><i>L. brevis</i></b> | <b><i>L. helveticus</i></b> |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| <b>0</b>                  | 0                          | 0                          | 0                       | 0                           |
| <b>1</b>                  | 0,175                      | 0,175                      | 0,222                   | 0,232                       |
| <b>2</b>                  | 0,178                      | 0,320                      | 1,410                   | 0,800                       |
| <b>4</b>                  | 0,614                      | 1,620                      | 2,240                   | 2,210                       |
| <b>6</b>                  | 1,900                      | 1,950                      | 2,670                   | 2,400                       |
| <b>8</b>                  | 5,860                      | 2,110                      | 2,780                   | 2,350                       |
| <b>10</b>                 | 8,040                      | 2,250                      | 2,770                   | 2,390                       |
| <b>22</b>                 | 11,100                     | 2,400                      | 2,480                   | 2,445                       |
| <b>24</b>                 | 11,400                     | 2,500                      | 2,190                   | 2,500                       |

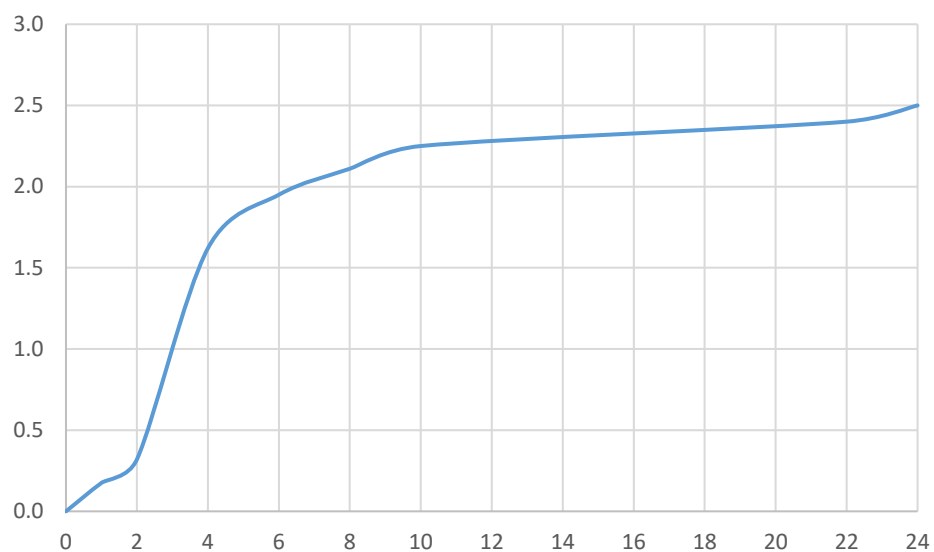
**Figura 22**

*Curva de crecimiento de *L. plantarum**

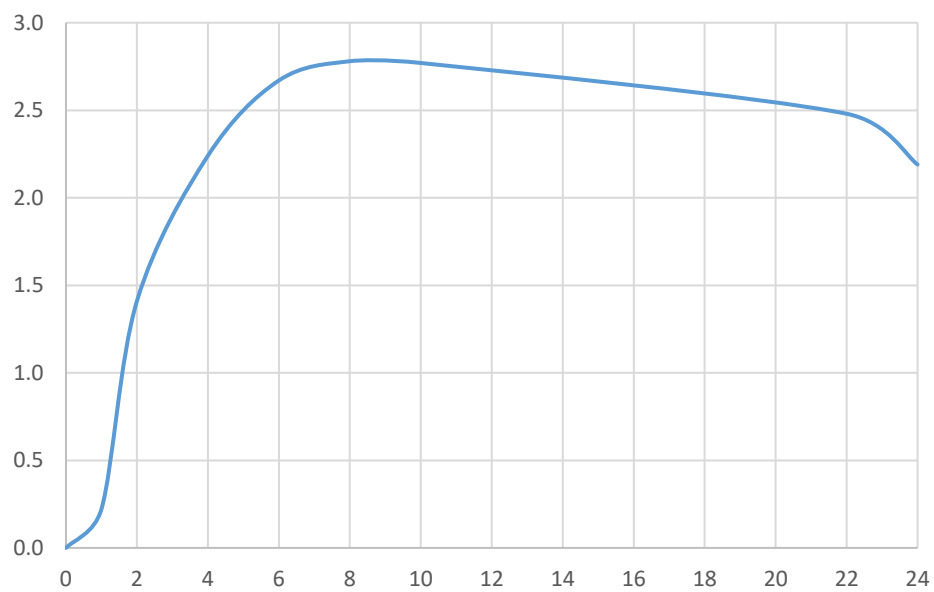


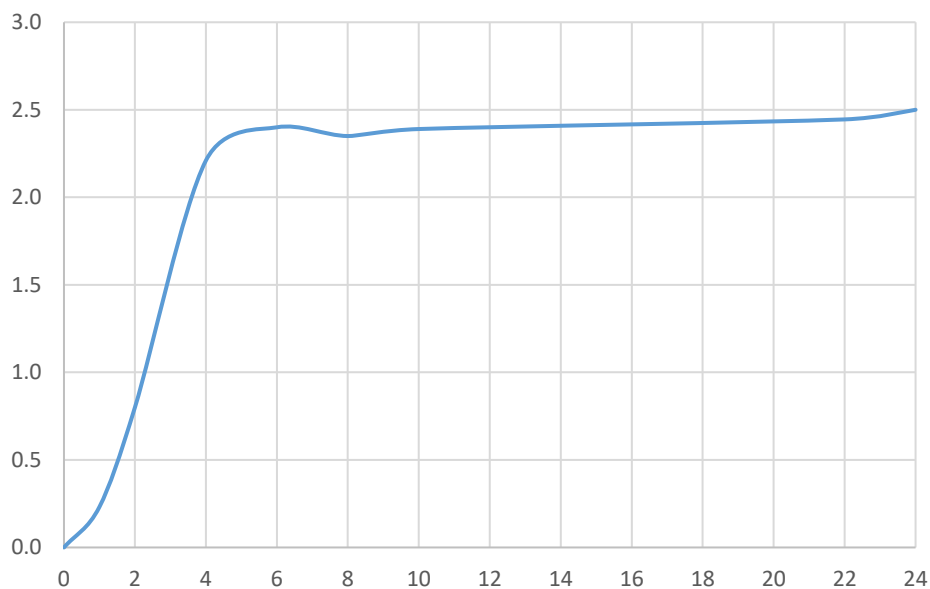
**Figura 23**

*Curva de crecimiento de L. fermentum*

**Figura 24**

*Curva de crecimiento de L. brevis*



**Figura 25***Curva de crecimiento de L. helveticus*

Se evaluó la absorbancia las especies con mayor efecto bactericida observando que a las primeras 4 horas, casi todas las especies llegan a su fase exponencial de crecimiento lo cual verifica las mediciones anteriores indicando que el mejor punto de evaluación o posible efecto bactericida se encuentra entre la primera y cuarta hora.

*L. plantarum* presentó absorbancias más altas al igual que *L. brevis*.

## CONCLUSIONES

1. A partir de 30 quesos artesanales elaborados con cuajo de alpaca y oveja procedentes de tres comunidades del distrito de Ocongate. Jullikunka 26,7% (8). Tinke 43,3% (13) y Lawa lawa 30% (9). Se realizó el recuento de colonias obteniendo  $16,5$  a  $95 \times 10^9$  UFC/gr. Según el cuajo utilizado para la elaboración de queso artesanal se encontró entre  $18 - 95 \times 10^9$  UFC/gr para quesos elaborados con cuajo de alpaca y entre  $16,5 - 55,5 \times 10^9$  UFC/gr para quesos elaborados con cuajo de oveja, se aislaron 102 colonias de BAL, según características fenotípicas del grupo de las BAL. Se realizó el aislamiento de 32 cepas, que fueron sometidos a una primera selección por el método de picada, siendo 17 de ellas, cepas que poseían halos entre 7 - 15 mm, los cuales fueron identificados. Las 17 cepas se identificaron mediante pruebas bioquímicas, permitiéndonos obtener las siguientes especies de *Lactobacillus* sp.: *L. fermentum*. (53%), *L. helveticus* (6%), *L. brevis* (29%) y *L. plantarum* (12%).
2. Por el método de Kirby Bauer modificada se determinó el efecto bactericida de las 17 cepas aisladas, presentando un efecto inhibitor sobre *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923. Se empleó los tratamientos estadísticos de ANOVA y Tukey y se llegó a la conclusión que el efecto bactericida de las especies aisladas es significativo en todos los casos, donde *L. herveticus* es más efectivo frente a *E. coli* y *L.plantarum* frente a *S.aureus*.
3. Se realizó la caracterización de las 4 cepas mediante cinética de crecimiento, donde *L. brevis*, *L. helveticus* y *L. fermentum* llegaron a su fase exponencial a las 2 horas de incubación en caldo MRS, en cambio *L. plantarum*, llegó a su fase exponencial a las 5 horas aproximadamente.

## RECOMENDACIONES

Al momento de recoger información en el muestreo. considerar aspectos que puedan influir en el aislamiento de *Lactobacillus sp.* como el tiempo de preparación, tipo de cuajo utilizado, manipulación en la preparación, entre otros.

En futuros estudios es recomendable hacer un muestreo con un número similar entre tipos de cuajo usado para tener una mayor variabilidad de datos.

En el aislamiento de *Lactobacillus sp.* probar otros medios de cultivo específicos como M17, LBS, medios enriquecidos, y otros.

Realizar la identificación de especies de *Lactobacillus sp.* con pruebas moleculares o sistemas estandarizados de pruebas bioquímicas.

Emplear técnicas y métodos que ayuden a aislar moléculas con efecto bactericida de los *Lactobacillus sp.*

Se sugiere seguir el estudio en diferentes ramas de investigación de las bacteriocinas de los *Lactobacillus sp.* para probar el efecto de biopreservación en diferentes tipos de alimentos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, D. L. (2018). “*Elaboración de Queso Saborizado Dulce y tipo Snack en el Centro Agronómico K’Ayra-Cusco.*” 1–109. Retrieved from [https://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/3599/253T20180192\\_TC.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/3599/253T20180192_TC.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Agudelo, M. (2023). *Bacteriocinas obtenidas de bacterias lácticas como posibles reemplazos a conservantes artificiales o químicos.*
- Agudelo, N., Torres, M., Alvarez, C., & Vélez, L. (2015). Bacteriocinas Producidas Por Bacterias Ácido Lácticas Y Su Aplicación En La Industria De Alimentos. *Alimentos Hoy*, 23(36), 63–72.
- Aguirre, Y. L., Nery, S. D., Campos, L. G., Flores, A. C., Palomo, L., Ascacio, J. A., Rodríguez, R. (2024). Lactic Acid Fermentation in the Food Industry and Bio-Preservation of Food. *Fermentation*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation10030168>
- Alquicira, L. (2006). Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Aparicio, G. M. (2016). *Aislamiento de bacterias lácticas de alimentos lácteos : producción de bacteriocinas* [Universidad de Jaén]. [https://www.google.es/search?source=hp&ei=n3CVWtPaKYH6zgKalbDIAw&q=produccion+de+bacteriocinas&oq=produccion+de+bacteriocinas&gs\\_l=psy-ab.3..0j0i22i](https://www.google.es/search?source=hp&ei=n3CVWtPaKYH6zgKalbDIAw&q=produccion+de+bacteriocinas&oq=produccion+de+bacteriocinas&gs_l=psy-ab.3..0j0i22i)
- Balciunas, E. M., Castillo Martinez, F. A., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. de M., Converti, A., & Oliveira, R. P. de S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review.

*Food Control*, 32(1), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>

- Bautista, Jorge & Huamán, Avila & Núñez, Jorge. (2024). Producción, comercialización y consumo de quesos en la zona norte de la región Lima-Perú (2015-2024) Production, marketing and consumption of cheeses in the northern area of the Lima-Peru region (2015-2024). *Journal of Scientific and Technological Research Industrial*. 5. 13-18. 10.47422/jstri.v5i2.51.
- Baylis C, Uyttendaele M, Joosten H, Davies A. (2011). The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry. *Enterobact Their Significance Food Ind*; Recuperado de: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20143006754.html>
- Borbonet, S., & Urrestarazu, P. (2010). *Quesos artesanales* (p. 32).
- Bulla, P. V., & Carreño, V. (2023). *Empleo de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) en el campo médico: una alternativa a la prevención de enfermedades digestivas*. 1–23.
- Celis, M. G. (2019). *Determinación de parámetros para la obtención y conservación de cuajo*
- Calle, J. P. (2016). *Aislamiento y determinación de la actividad antibacteriana de bacterias ácido lácticas presentes en el suero de quesos artesanales de la Provincia de Cañar contra cepas patógenas*. Universidad del AZUAY.
- Carol, J. J., Sesín, A. A., Gómez, J. N., Iturriaga, L. B., Ledesma, A. E., & Bustos, A. Y. (2021). Aislamiento y evaluación funcional de bacterias lácticas autóctonas de Santiago del Estero. *Revista Investigaciones En Facultades de Ingeniería Del NOA*, 331, 331–336.
- Celis, M. G. (2019). *Determinación de parámetros para la obtención y conservación de cuajo bovino en el distrito de Cajamarca*.



- Churqui, J. M. (2020). *BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE CEPAS DE Escherichia coli Y Staphylococcus aureus DE QUESOS FRESCOS EXPENDIDOS EN TRES MERCADOS DE LA CIUDAD DE PUNO – 2017*. Universidad Nacional del Altiplano.
- Cobo, R., Rosas, R., Gálvez, D., Adriano, L. & Vázquez, A. (2019). Bacterias ácido lácticas nativas como cultivo iniciador para la elaboración de queso crema mexicano. *Agronomía Mesoamericana*. 30(3): 855-870.
- Condo, D. M. (2016). *Determinación de la calidad bacteriológica en quesos frescos artesanales que se expenden en El Mercado Andrés Avelino Cáceres en la ciudad De Arequipa, Mayo – Agosto 2015*. 81.  
<http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/1865/Bicopadm.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Córdova, J. (2009a). *DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PARA OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE CUAJO DE BOVINO ADULTO*.
- Córdova, J. (2009b). *Determinación de Parámetros para Obtención y Conservación de Cuajo de Bovino de Adulto*. 94.
- Cristóbal, R. L. (2008). *Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Cristóbal, R. L., & Maurtua, D. J. (2003). *Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima , Perú , y la supuesta acción bactericida de Lactobacillus spp .* 14(3), 158–164.

- Datsa, C. (2017). Quesos madurados, composición química, clasificación, características, formas de procesamiento y equipos y maquinarias. *Monografía*, 88.
- De Cangas, R., Llavona, A., Lopez-Sela, P., Aguirre, S., & Hernández, A. (2019). Desarrollo de un queso fresco con cultivos probióticos e ingredientes vegetales. *Tecnología Química*, 39(1), 49–64. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-61852019000100049&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2224-61852019000100049&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852019000100049&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2224-61852019000100049&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Durán, M., Montero, P., Flórez, W., Franco, V., & Coneo, R. (2010). Evaluación higiénico-sanitaria y acción antagonica de cepas de Lactobacilos comerciales frente a microorganismos patógenos (*Escherichia coli*) presentes en el queso de capa del municipio de mompox. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 20(3), 312–317.
- FAO. (2003). Condiciones Estructurales, Evolución (1990-2000) y Perspectivas (2010, 2020, 2030) de Centro América. AGAL. Centro América. 54 p.
- Favaro, L., Barretto, A.L., Todorov, S.D. (2015). Bacteriocinogenic LAB from cheeses Application in biopreservation? *Trends Food Sci. Tech.* (41) 37-48.
- Fuentes, L., Acevedo, D., & Gelvez, V. M. (2015). Alimentos Funcionales: Impacto Y retos Para El Desarrollo Y Bienestar De La Sociedad Colombiana. *Biotechnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2), 140–149. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(13\)140-149](https://doi.org/10.18684/bsaa(13)140-149)
- Fuentes, M., Londoño, A., Durango, M., Gutiérrez, M., Ochoa, S., & Sepúlveda, J. (2017). Capacidad Antimicrobiana De Bacterias Ácido Lácticas Autóctonas Aisladas De Queso Doble Crema Y Quesillo Colombiano. *Biotechnología En El Sector Agropecuario y*

- Agroindustrial*, 15(1), 45–55. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(15\)45-55](https://doi.org/10.18684/bsaa(15)45-55)
- Gandolfo, G. S. (2021). *Detección y caracterización de bacterias lácticas nativas con capacidad de antibiosis aisladas de quesos regionales*. UNMSM.
- García, K. M. (2016). “*EFEECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE Cinnamomum Zeylanicum (CANELA) SOBRE EL Fusobacterium Nucleatum ATCC 25586.*” Universidad Nacional de Trujillo.
- Gimferrer M. N. (2014). Las siete bacterias más comunes en alimentos. EROSKI CONSUMER. Recuperado de <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2013/02/04/215614.php>
- Gonzáles, P. (2018). *Definiciones de Leche y Queso*. 4.
- González-Martínez, B., Gómez-Treviño, M., & Jiménez-Salas, Z. (2003). Bacteriocinas De Probióticos. *Revista Salud Publica y Nutricion*, 4(2), 8.
- Grande, M. J., Pérez, R., Cobo, A., Lucas, R., & Gálvez, A. (2017). BIOCONSERVACIÓN DE ALIMENTOS LÁCTEOS. *Anales*, 30(1).
- Gutiérrez, I. E. (2019). “*Efecto Antagónico in vitro de Lactobacillus spp. aislados de ‘tocosh’- Solanum sp., proveniente de Huánuco, frente a bacterias enteropatógenas*” [Universidad Privada Norbert Wiener]. <http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/3656>
- Heredia, P. y., Hernandez, A., González, A., & Vallejo, B. (2017). Bacteriocinas de Bacterias Acido Lacticas:Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patogenos en quesos. *Interciencia*, 42, 340–346. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33951621002.pdf>
- Jaramillo, D. (2009). *Evaluacion de la produccion de bacteriocinas a partir de Lactobacillus y*

*Bifidobacterium*.

1–99.

<https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/25208/u371540.pdf?sequence=1>

Jurado, H., & Jarrín, V. (2015). Cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas. *ResearchGate*, 14(2), 49–62.  
<https://doi.org/10.17151/biosa.2015.14.2.5>

Loayza, K. (2019). “*Evaluación de la producción de queso Blando en la Planta Lechera de Ccolcca - Ocongate*.” Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

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

Mago, Y., Sanabria, N., Cova, A., Alvarado, C., & Durán, L. (2015). Maduración de queso de cabra con cepa autóctona de *Leuconostoc mesenteroides* aislada de queso artesanal. *Revista de La Facultad de Ciencias Veterinarias*, 56(1), 3–9.

Martín del Campo, C. I., Gómez, H. E., & Alaníz de la O, R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *E-Gnosis*, 6, 1–17. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73011197005>

Martínez, V., Del Moral, S. T., Sachman, B., Ramírez, L. P., & García, M. de J. (2016). Dinámica poblacional y aislamiento de bacterias ácido lácticas en lactosuero fermentado. *Nova Scientia*, 8(2), 326–339.

MINSA, & INS. (2018). *Unidad temática N° 5 Vigilancia y conservación de alimentos*.  
<http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4518.pdf>

- Molleda, M. M. (2016). Frecuencia de enterobacterias en queso fresco, carne molida y fresa en el mercado mayorista “La Parada” [Universidad Nacional Mayor De San Marcos]. In *Repositorio de Tesis - UNMSM*. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/4645>
- Mondragón, G., Escalante, P., Osuna, J. A., Ibarra, V., Morlett, J. A., Aguilar, C., & Rodríguez Raúl. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21, 64–70.
- Mujica, F. R., & Hernández, J. E. (2023). Actividad coagulante del extracto enzimático de tejido abomasal de alpaca sobre leche bovina. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 25(1), 32–40. <https://doi.org/10.18271/ria.2023.493>
- Municipalidad distrital de Ocongate. (2019). *Mejoramiento y ampliación de la capacidad técnica y operativa de la sub gerencia de desarrollo económico para mejorar la producción agrícola de los productos altoandinos del distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchi-Cusco*.
- Neria, A. (2006). *Evaluación de la capacidad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Novillo, A. A. (2016). Aislamiento y determinación de la actividad antibacteriana de bacterias ácido lácticas de quesos artesanales de San Bernardo-Azuay contra cepas patógenas. *Univesidad Del Azuay*. 12686.pdf
- Orejuela, R. R. (2023). Ecoeficiencia del aprovechamiento del lactosuero para la obtención de *Lactobacillus* de acción bactericida. *Universidad Nacional de Educación*, 1–98. [https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14074/5165/Tesis](https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14074/5165/Tesis%20Lorena%20Medina.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Parra, R. (2010). Review. bacterias acido lacticas: papel funcional en los alimentos. *Biotechnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 8(1), 93–105.
- Peralta, L. P. (2014). *Actividad antagónica de bacterias ácido lácticas aisladas de queso fresco artesanal frente a Listeria monocytogenes y Escherichia coli*. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Pérez, J., Rocha, E., Uzcategui, D., Aranguren, Y., & Machado, E. (2015). Aislamiento , Selección Y Caracterización De Cepas Del Género Lactobacillus Aisladas De Líquido Ruminal Vacuno En La Zona Sur Del Lago , Venezuela. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 7(2), 165–170. <http://www.recia.edu.co>
- Pessione E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front Cell Infect Microbiol*. 2:86
- Pineda, E.B. & De Alvarado, E.L. (2008). Metodología de la investigación. *Organización Panamericana de la Salud. Issue 47 of serie PALTEX para ejecutores de programas de salud*.
- Pulido, G. A. (2013). “Aislamiento e identificación de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas presentes en queso que se elaboran y comercializan en la provincia de Huarochiri, departamento de Lima” [Universidad Ricardo Palma]. [http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/1713/Anthony\\_Pulido.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/1713/Anthony_Pulido.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Quillama, E., Cruz, L., & Gandolfo, G. (2020). Selección y caracterización de cepas nativas de Enterococcus con potencialidad antimicrobiana aisladas de quesos de elaboración artesanal [Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú]. In *Ecología Aplicada* (Vol. 19, Issue

1). <https://doi.org/10.21704/rea.v19i1.1443>

- Radaic, A., de-Jesus, M. B., & Kapila, Y. L. (2020). Bacterial antimicrobial peptides and nano-sized drug delivery systems: The state of the art toward improved bacteriocins. *Journal of Controlled Release*. (321): 100-118
- Ramírez, C., & Vélez, J. F. (2012). Quesos frescos : propiedades , métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2, 131–148.
- Ramírez, C., & Vélez, J. F. (2016). Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Informacion Tecnologica*, 27(6), 115–128. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600012>
- Ramirez, F. A. (2010).  *AISLAMIENTO DE BACTERIAS Lactobacillus sp y LEVADURAS A PARTIR DE PRODUCTOS LACTEOS ARTESANALES Y EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTAGONICA IN VITRO*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Rodriguez, N. K. (2018). *Identificación taxonómica de microorganismos responsables de la fermentación espontánea del ají charapita “ Capsicum frutescens .”*
- Salazar, L. G. (2017). *Aislamiento y caracterizacion de microorganismos durante el proceso de fermentación de Theobroma Cacao L. de la variedad “Chuncho” obtenida en Cuzco, Perú* (Vol. 0, Issue 0) [Universidad Peruana Cayetano Heredia]. [http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/1436/Aislamiento\\_SalazarAlvarez\\_Lilian.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/1436/Aislamiento_SalazarAlvarez_Lilian.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Salcedo, M. R. (2021). *"Efecto Antagónico de Bacterias Ácido Lácticas Aisladas de Tocosh sobre Listeria innocua"*. Universidad Nacional Agraria La Molina.

- Sauer, M., Russmayer, H., Grabherr, R., Peterbauer, C. K., & Marx, H. (2017). The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. *Trends in biotechnology*, 35(8), 756–769. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.05.002>
- Sierra, L, Montoya, O, Ciro, H.J. (2013). Evaluación de la nisina como sustancia inactivadora de *Bacillus licheniformis* en el extracto líquido de café. *Revista MVZ. prilla*;18.
- Vásquez, S. M., Suárez, H., & Montoya, O. I. (2009). Evaluación de bacteriocinas como medio protector para la biopreservación de la carne bajo refrigeración. *Revista Chilena de Nutricion*, 36(3), 228–238. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182009000300005>
- Vásquez, N.C., Duran, L., Sánchez, C., Acevedo, I. (2012). Evaluación de las buenas prácticas de fabricación del queso blanco en seis distribuidores del estado Lara. *Zootec Trop*, 30(4):317-26.
- Vizcaíno, R., Masias, C, Márquez, J.C., Morales, A., & Torres, N. (2016). USOS CLÍNICOS DE LOS PROBIÓTICOS. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 79(1), 029-040. Recuperado en 17 de junio de 2025, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06492016000100007&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06492016000100007&lng=es&tlng=es).
- Wong, A., Corzo, H., Hernández, E., González, A., & Giacomán, G. (2021). Caracterización de bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana aisladas del queso crema de Chiapas, México. *Ciencia UAT*, 15(2), 144–155. <https://doi.org/https://doi.org/10.29059/cienciauat.v15i2.1368>
- Yusuf, M. A. (2013). Lactic Acid Bacteria:Bacteriocin Producer: A Mini Review. *IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR)*, 3(4), 44–50. <https://doi.org/10.9790/3013-034104450>



Zamora, L. M. (2003). *Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero* [Universitat de Girona].  
<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/7925/Tlzt.pdf;jsessionid=E753D716FF66DD25AA91BA0C211C598B?sequence=4>

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### MUESTREO DE QUESOS ARTESANALES



Distrito de Ocongate



Llenado de  
etiqueta de  
muestreo



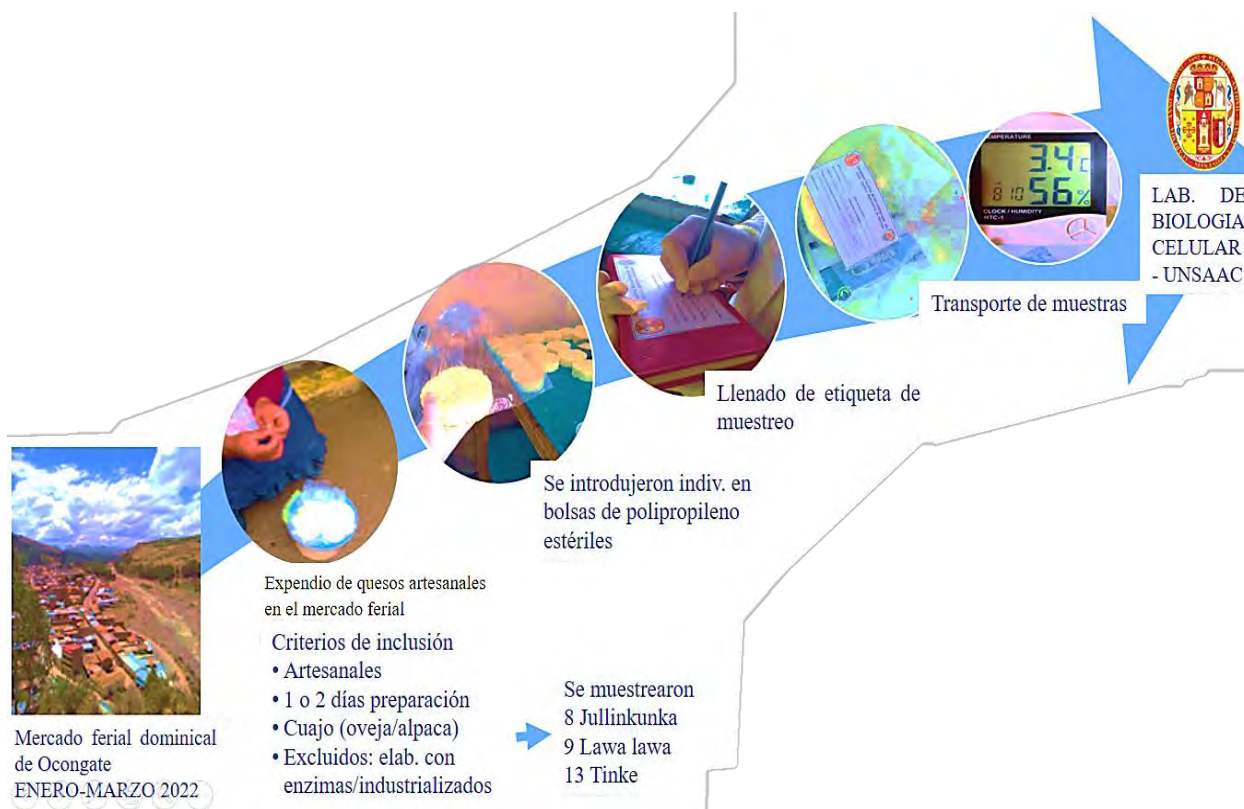
Transporte de  
muestras



Muestreo de queso  
artesanal



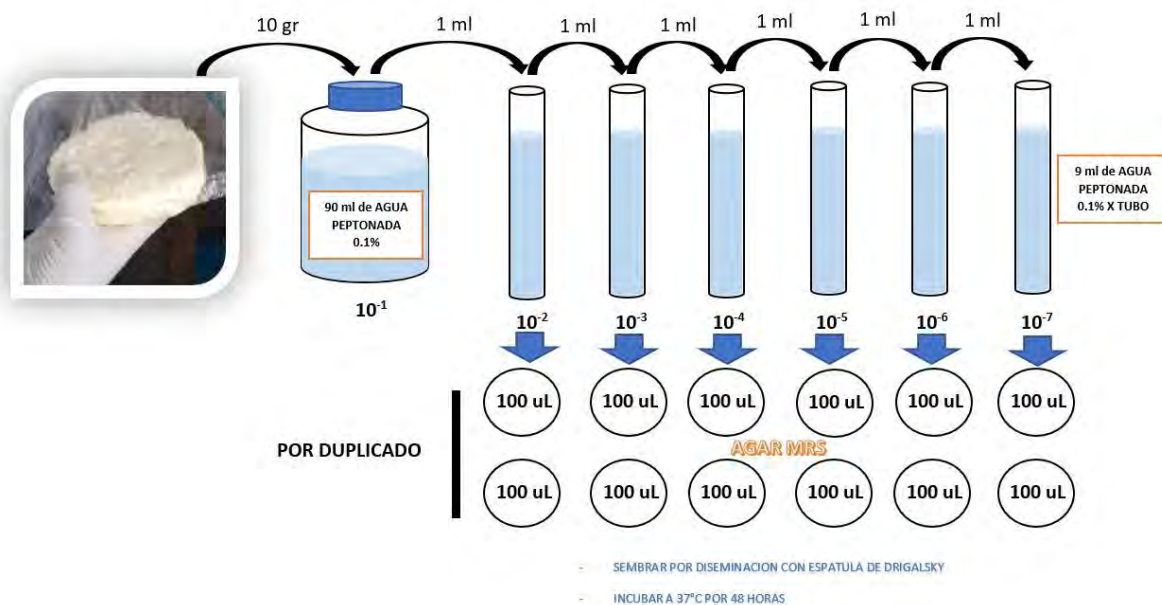
Expendio de quesos artesanales  
en el mercado ferial



## ANEXO 2.

### PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

#### *Método de diluciones seriadas*



*Fuente propia.*



Preparación de medios de cultivo

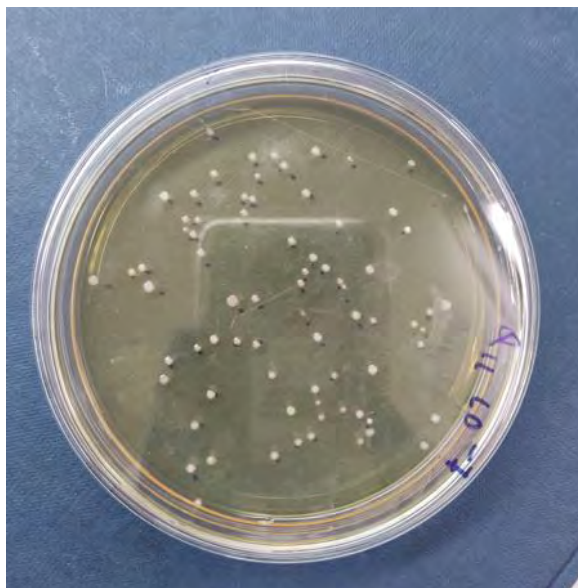




Preparación de material estéril



Acondicionamiento de muestras

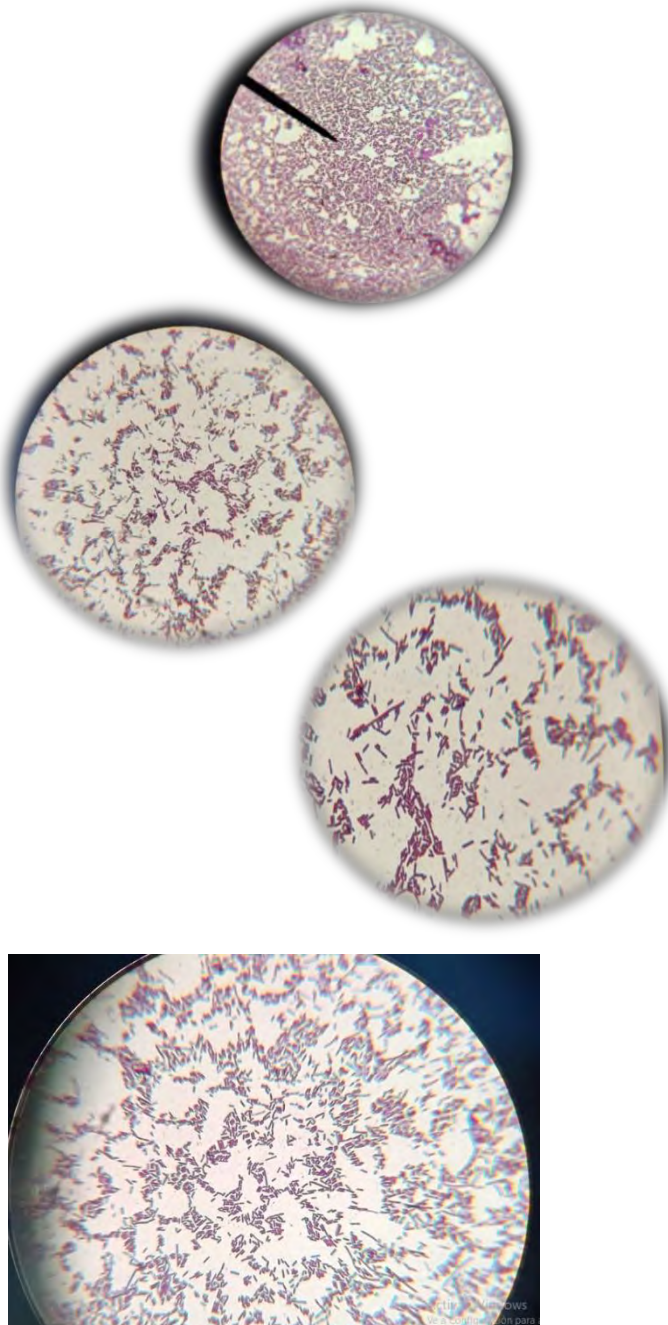
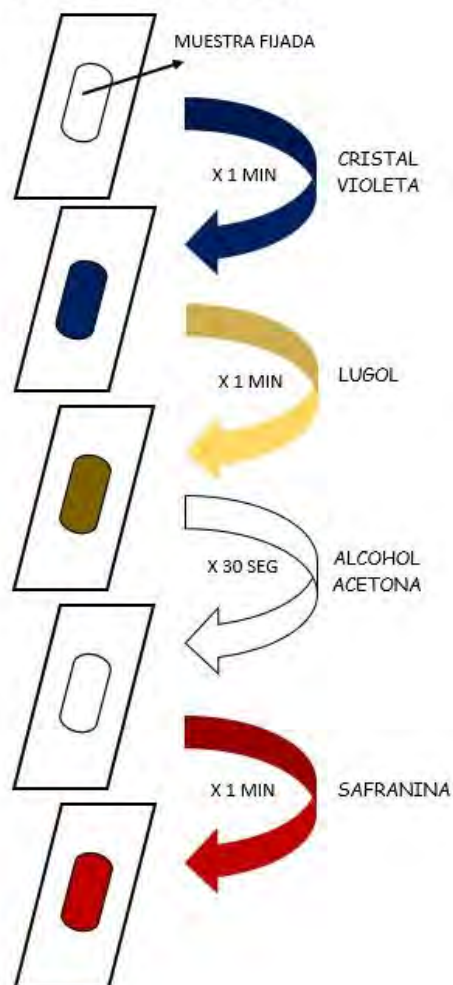


Homogenización de las muestras y cultivo en medio MRS

## ANEXO 3.

## IDENTIFICACIÓN POR COLORACIÓN GRAM, CATALASA Y OXIDASA

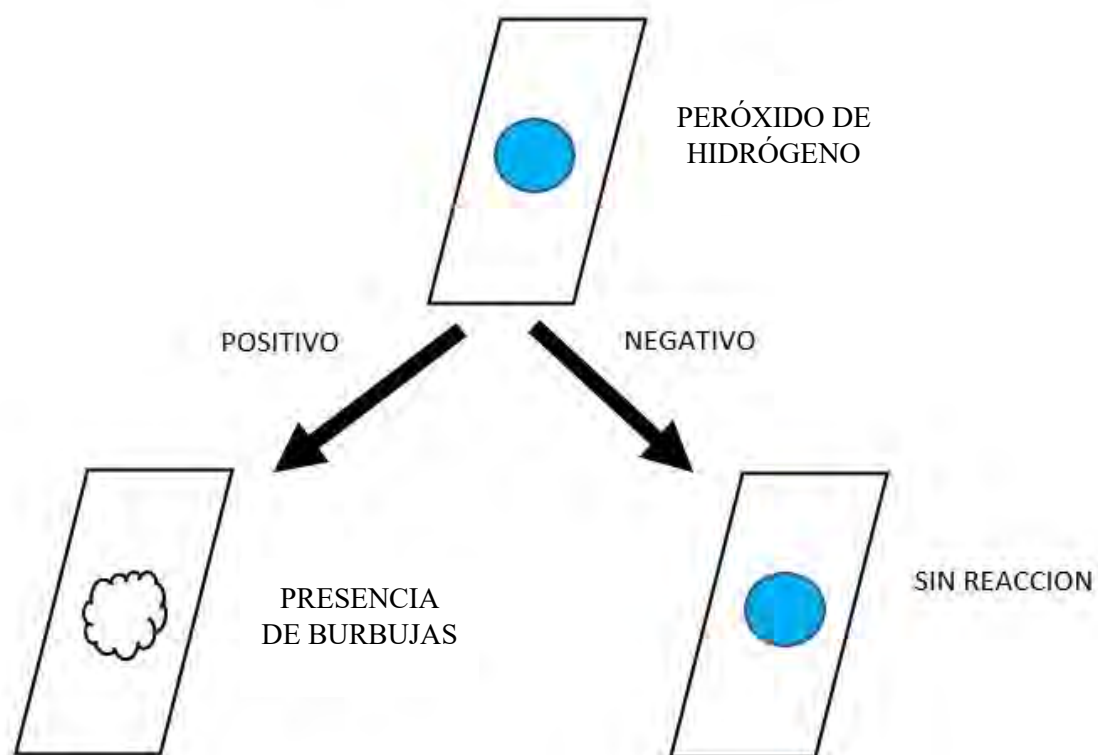
## COLORACION GRAM



OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA A 1000 X DE  
AUMENTO DE *Lactobacillus* sp.:

BACILOS GRAM POSITIVOS

## REACCIÓN DE CATALASA





1.13300.0001

## Microbiología

### Bactident® Oxidasa

para detección de la citocromooxidasa  
en microorganismos



Producto sanitario para diagnóstico in vitro



**Contenido: 50 varillas indicadoras**  
**Para uso profesional solamente**

#### Empleo

Para detección de la citocromooxidasa en microorganismos.

#### Composición

La zona reactiva de una tira de ensayo contiene:  
dicloruro de N,N-dimetil-1,4-fenilendiamonio 0,1 µmol;  
1-naftol 1,0 µmol.

#### Fundamento

La citocromooxidasa es un enzima del grupo de la porfirina férrica muy difundido en la naturaleza. Ella oxida el citocromo c reducido y entonces se transforma ella misma en la forma reducida e inactiva. Por transferencia de los electrones a oxígeno molecular la citocromooxidasa se transforma de nuevo en la forma activa. En presencia de oxígeno molecular el sistema citocromooxidasa/citocromo c puede reducir toda una serie de sustancias orgánicas, entre otras el llamado reactivo NaDi (1-naftol + dimetilparafenilendiamina) con formación de la molécula de condensación, azul de indofenol. Esta reacción se emplea para clasificar e identificar bacterias.

#### Empleo

Cada vez se examinan las colonias individuales crecidas sobre un medio de cultivo, o, en el caso de cultivos puros, un asa de inoculación. La reacción puede realizarse, en lugar de con la masa bacteriana, con una suspensión espesa de bacterias.

**„Para evitar resultados falsamente positivos trabajar exclusivamente con asas de platino.“**

Ver instrucciones generales para uso

#### Estabilidad

Ver fecha de caducidad.

Tomar solamente la correspondiente cantidad de varillas que se necesite. No tocar las zonas reactivas de la varilla indicadora. Cerrar inmediatamente de nuevo los recipientes. No son utilizables las varillas indicadoras con zona reactiva coloreada intensamente de pardo. Almacenar a la temperatura indicada.

#### Almacenaje

Almacenar en lugar fresco, seco y en recipiente bien cerrado de +2 °C a +8 °C.

#### Eliminación correcta

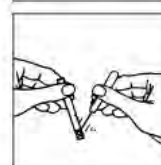
Después de usarlas, las varillas indicadoras deben eliminarse de la misma manera que el material bacteriano. Esto puede realizarse mediante combustión, tratamiento en autoclave o introducción en una solución desinfectante del 5 hasta el 6%, durante mínimo 6 horas.

#### Técnica

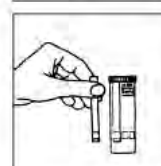
Con el asa de inoculación tomar del medio de cultivo una colonia aislada, que haya crecido bien.



Aplicar la colonia sobre la zona reactiva y frotar con el asa de inoculación.



Al cabo de aprox. 20 a 60 segundos comparar con la escala colorimétrica.



#### Evaluación

En el caso de gérmenes citocromooxidasa-positivos la zona reactiva se colorea de azul a violeta azulado.

Microorganismos oxidasa-**positivos** importantes en medicina

|                                |                            |
|--------------------------------|----------------------------|
| Neisseria (todas las especies) | Actinobacillus lignieresii |
| Aeromonas spp.                 | Actinobacillus equuli      |
| Pasteurella spp.               | Bordetella pertussis       |
| Vibrio spp.                    | Bac. anthracis             |
| Cordibacterium hominis         | Bac. subtilis              |
| Pseudomonas spp.               | Brucella spp.              |
| Flavobacterium spp.            | Chromobacterium spp.       |
| Alcaligenes spp.               | Eikenella corrodens        |
| Moraxella spp.                 | Plesiomonas spp.           |
| Campylobacter spp.             | Branhamella catarrhalis    |
| Micrococcus spp.               |                            |

Microorganismos oxidasa-**negativos**

|                         |                          |
|-------------------------|--------------------------|
| Staphylococcus spp.     | Pseudomonas mallei       |
| Streptococcus spp.      | Pseudomonas maltophilia  |
| Gemella haemolysans     | Bordetella parapertussis |
| Peptococcus spp.        | Actinobacillus           |
| Peptostreptococcus spp. | actinomyoetern-comitans  |
| Leuconostoc spp.        | Anaerobier (todos)       |
| Corynebacterium spp.    | Haemophilus spp.         |
| Listeria spp.           | Pasteurella haemolytica  |
| Lactobacillus spp.      | tipo T                   |
| Bacillus spp.           | Streptobacillus          |
| Enterobacteriaceae      | Mycoplasma spp.          |
| (todos los géneros)     | Acholeplasma spp.        |
| Acinetobacter spp.      |                          |

#### Nota:

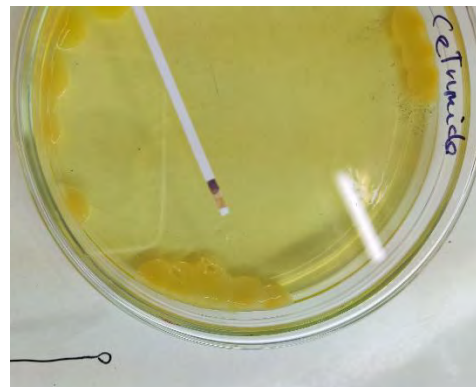
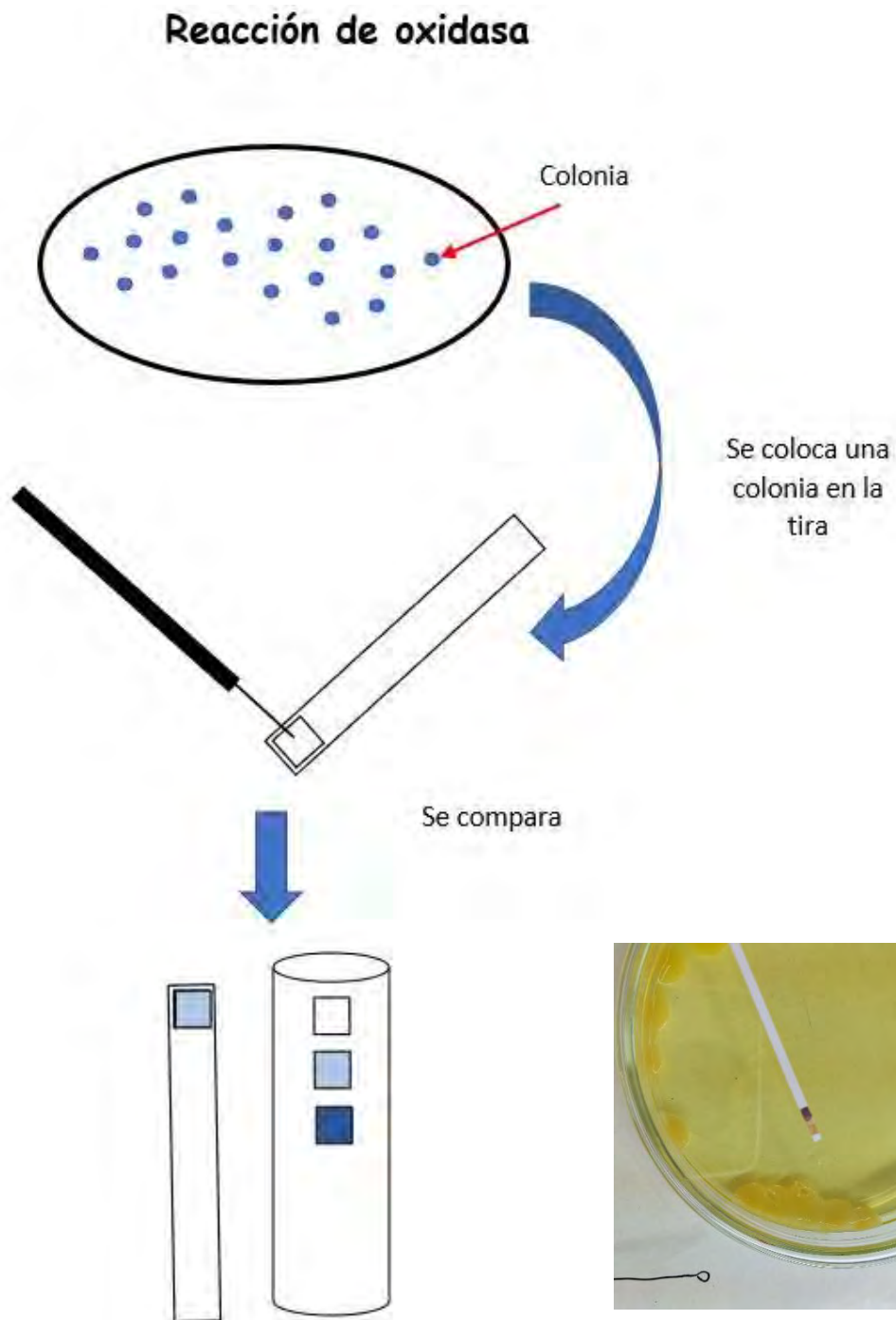
Se recomienda realizar siempre un ensayo de control con un cultivo negativo (p.ej. E. coli), con un cultivo débilmente positivo (p.ej. Pasteurella) y con un cultivo fuertemente positivo (p.ej. Pseudomonas o Aeromonas). Para este ensayo son adecuados sobre todo cultivos de medios nutritivos sin colorantes, indicadores o inhibidores. Si el cultivo bacteriano mismo muestra un color, debe tenerse en cuenta esto al evaluar el ensayo.

Las colonias de bacterias que fueron tomadas de medios con valores de pH por debajo de 5,5 (p.ej. tras metabolismo de hidratos de carbono y acidificación consiguiente del medio de cultivo), pueden mostrar una reacción de oxidasa falsamente **negativa**. En estos casos, los microorganismos, antes de la identificación de oxidasa, deberían someterse a un pasaje intermedio a un medio, en el cual no pueda tener lugar una disminución del valor del pH por debajo de 6,0 debido a la correspondiente bacteria.

Version 2007-10-29

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany, Tel. + 49 (0)61 51 72-2440, www.merck.de



*Reacción de oxidasa***CONTROL POSITIVO**

## ANEXO 4

Tabla 21

*Número de colonias de BAL por queso y procedencia con características fenotípicas, catalasa, oxidasa y coloración Gram.*

| CÓDIGO | PROMEDIO DE RECuentOS | CÓDIGO DE CEPA | CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS   | CATALASA | OXIDASA  | COLORACIÓN GRAM            |
|--------|-----------------------|----------------|---|----------|----------|----------------------------|
| Q1L    | 51 x 10 <sup>9</sup>  | Q1L-A          | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|        |                       | Q1L-B          | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
|        |                       | Q1L-C          | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero             | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|        |                       | Q1L-D          | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|        |                       | Q1L-E          | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Cocos Gram positivos       |
| Q2T    | 44 x 10 <sup>9</sup>  | Q2T-A          | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero             | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|        |                       | Q2T-B          | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Bacilos Gram Negativos     |
|        |                       | Q2T-C          | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
|        |                       | Q2T-D          | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero             | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
| Q3T    | 41 x 10 <sup>9</sup>  | Q3T-A          | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
|        |                       | Q3T-B          | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Bacilos Gram Negativos     |
|        |                       | Q3T-C          | Pequeña, Blanquecina, consistencia ligosa, superficie convexa, borde entero | Positivo | Negativo | Levaduras                  |
|        |                       | Q3T-D          | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|        |                       | Q3T-E          | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Cocos Gram positivos       |
| Q4L    | 79 x 10 <sup>9</sup>  | Q4L-A          | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|        |                       | Q4L-B          | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Bacilos Gram Negativos     |
|        |                       | Q4L-C          | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
| Q5T    | 95 x 10 <sup>9</sup>  | Q5T-A          | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|        |                       | Q5T-B          | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|        |                       | Q5T-C          | Blanquecina, pequeña, superficie umbilicada, borde entero                   | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
|        |                       | Q5T-D          | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |

|      |                        |        |   |          |          |                            |
|------|------------------------|--------|---|----------|----------|----------------------------|
| Q6T  | 76 x 10 <sup>9</sup>   | Q6T-A  | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero             | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q6T-B  | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero             | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q6T-C  | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
| Q7L  | 73.5 x 10 <sup>9</sup> | Q7L-A  | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
|      |                        | Q7L-B  | Amarillenta, pequeña, superficie umbilicada, borde entero                   | Negativo | Negativo | Cocos Gram positivos       |
|      |                        | Q7L-C  | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero             | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
| Q8L  | 85 x 10 <sup>9</sup>   | Q8L-A  | Pequeña, Blanquecina, consistencia ligosa, superficie convexa, borde entero | Positivo | Negativo | Levaduras                  |
|      |                        | Q8L-B  | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Cocos Gram positivos       |
|      |                        | Q8L-C  | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero             | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q8L-D  | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q8L-E  | Amarillenta, pequeña, superficie umbilicada, borde entero                   | Negativo | Negativo | Cocos Gram positivos       |
| Q9T  | 55.5 x 10 <sup>9</sup> | Q9T-A  | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q9T-B  | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
|      |                        | Q9T-C  | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
|      |                        | Q9T-D  | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
| Q10L | 82.5 x 10 <sup>9</sup> | Q10L-A | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero             | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q10L-B | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q10L-C | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
| Q11J | 58.5 x 10 <sup>9</sup> | Q11J-A | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q11J-B | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Cocos Gram positivos       |
|      |                        | Q11J-C | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero             | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
| Q12J | 77 x 10 <sup>9</sup>   | Q12J-A | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q12J-B | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q12J-C | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q12J-D | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero                      | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
| Q13J | 38 x 10 <sup>9</sup>   | Q13J-A | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q13J-B | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero              | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |



|      |                        |         |  |          |          |                            |
|------|------------------------|---------|--|----------|----------|----------------------------|
|      |                        | Q13J-C  | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero           | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q13J-D  | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero                   | Negativo | Negativo | Cocos Gram positivos       |
|      |                        | Q13J-E  | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero                   | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
|      |                        | Q13J-F  | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero                   | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
| Q14J | 53 x 10 <sup>9</sup>   | Q14J-A  | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero           | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q14J-B  | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero           | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q14J-C  | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero           | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q14J-D  | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero           | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
| Q15J | 64.5 x 10 <sup>9</sup> | Q15J-A  | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero                   | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
|      |                        | Q15J-B  | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero           | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q15J-C  | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero                   | Negativo | Negativo | Cocos Gram Positivos       |
|      |                        | Q15J-D  | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero                   | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
| Q16T | 67 x 10 <sup>9</sup>   | Q16T-A  | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero                   | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q16T-B  | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero          | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram Positivos |
| Q17T | 35.5 x 10 <sup>9</sup> | Q17T-A  | Colonias pequeñas blanquecinas, borde entero, consistencia ligosa/mucosa | Positivo | Negativo | Levaduras                  |
|      |                        | Q17T-B  | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero           | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q17T-C  | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero           | Negativo | Negativo | Bacilos Gram Positivos     |
|      |                        | Q17T-D  | Colonias pequeñas blanquecinas, borde entero, consistencia ligosa/mucosa | Negativo | Negativo | Levaduras                  |
|      |                        | Q17T-E  | Colonias pequeñas blanquecinas, borde entero, consistencia ligosa/mucosa | Positivo | Negativo | Levaduras                  |
| Q18J | 18 x 10 <sup>9</sup>   | Q18J-A  | Colonias pequeñas blanquecinas, borde entero, consistencia ligosa/mucosa | Positivo | Negativo | Levaduras                  |
|      |                        | Q18J-B  | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero           | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
| Q19J | 16.5 x 10 <sup>9</sup> | Q19J-A  | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero           | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q19J-B  | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero           | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q19J -C | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero           | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
| Q20L | 21 x 10 <sup>9</sup>   | Q20L-A  | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero                   | Negativo | Negativo | Cocos Gram Positivos       |
|      |                        | Q20L-B  | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero          | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |

|      |                        |        |   |          |          |                            |
|------|------------------------|--------|---|----------|----------|----------------------------|
|      |                        | Q20L-C | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero          | Negativo | Negativo | Cocos Gram Positivos       |
|      |                        | Q20L-D | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero          | Negativo | Negativo | Cocos Gram Positivos       |
| Q21L | 48 x 10 <sup>9</sup>   | Q21L-A | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero          | Negativo | Negativo | Cocos Gram Positivos       |
|      |                        | Q21L-B | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero          | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q21L-C | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero          | Negativo | Negativo | Cocos Gram Positivos       |
| Q22L | 45.5 x 10 <sup>9</sup> | Q22L-A | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero          | Negativo | Negativo | Cocos Gram Positivos       |
|      |                        | Q22L-B | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero          | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q22L-C | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero          | Negativo | Negativo | Cocos Gram Positivos       |
| Q23L | 31.5 x 10 <sup>9</sup> | Q23L-A | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero          | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram positivos |
|      |                        | Q23L-B | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero  | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q23L-C | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero          | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram positivos |
| Q24J | 38 x 10 <sup>9</sup>   | Q24J-A | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q24J-B | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q24J-C | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q24J-D | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q24J-E | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q24J-F | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q24J-G | Colonia amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero  | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
| Q25T | 32 x 10 <sup>9</sup>   | Q25T-A | Colonias amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q25T-B | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero  | Negativo | Negativo | Cocos Gram Positivos       |
|      |                        | Q25T-C | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero  | Negativo | Negativo | Cocos Gram Positivos       |
| Q26T | 34.5 x 10 <sup>9</sup> | Q26T-A | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero, cremosa | Negativo | Negativo | Cocos Gram Positivos       |
|      |                        | Q26T-B | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero          | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
| Q27T | 34.5 x 10 <sup>9</sup> | Q27T-A | Colonia amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero  | Negativo | Negativo | Bacilos Gram positivos     |
|      |                        | Q27T-B | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero  | Negativo | Negativo | Cocos Gram positivos       |
|      |                        | Q27T-C | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero  | Negativo | Negativo | Cocos Gram positivos       |
| Q28T | 34 x 10 <sup>9</sup>   | Q28T-A | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero, cremosa | Negativo | Negativo | Cocobacilos Gram positivos |

|       |                      |        |   |          |   |                            |
|-------|----------------------|--------|---|----------|---|----------------------------|
| Q29T  | 94 x 10 <sup>9</sup> | Q28T-B | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero, cremosa | Negativo | Negativo  | Bacilos Gram positivos     |
|       |                      | Q28T-C | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero, cremosa | Negativo | Negativo  | Cocobacilos Gram positivos |
|       |                      | Q29T-A | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero, cremosa | Negativo | Negativo  | Cocobacilos Gram positivos |
|       |                      | Q29T-B | Blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero, cremosa | Negativo | Negativo  | Cocobacilos Gram positivos |
|       |                      | Q29T-C | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero  | Negativo | Negativo  | Bacilos Gram positivos     |
|       |                      | Q29T-D | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero, cremosa | Negativo | Negativo  | Cocobacilos Gram positivos |
|       |                      | Q30T-A | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero  | Negativo | Negativo  | Bacilos Gram positivos     |
|       |                      | Q30T-B | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero, cremosa | Negativo | Negativo  | Cocos Gram Positivos       |
|       |                      | Q30T-C | Colonia blanquecina, pequeña, superficie convexa, borde entero  | Negativo | Negativo  | Bacilos Gram positivos     |
|       |                      | Q30T-D | Amarillenta, pequeña, superficie convexa, borde entero, cremosa | Negativo | Negativo  | Cocobacilos Gram positivos |
| TOTAL |                      |        |   |          |   |                            |
| 32    | -                    | 111    | -   | -        | Bacilos Gram positivos: 58<br>Cocobacilos Gram positivos: 23<br>Cocos Gram positivos: 21<br>Bacilos Gram negativos: 3<br>Levaduras: 6 |                            |

**Tabla 22***Porcentajes de microorganismos aislados*

| SEGÚN COLORACIÓN GRAM      | CANTIDAD   | PORCENTAJE  |
|----------------------------|------------|-------------|
| Bacilos Gram positivos     | 58         | 52.25%      |
| Cocobacilos Gram positivos | 23         | 20.72%      |
| Cocos Gram positivos       | 21         | 18.92%      |
| Bacilos Gram negativos     | 3          | 2.7%        |
| <b>OTROS</b>               |            |             |
| Levaduras                  | 6          | 5.41%       |
| <b>TOTAL</b>               | <b>111</b> | <b>100%</b> |

## ANEXO 5

## ACTIVACION DE LAS CEPAS ATCC, 25922 Y 25923



## INSTRUCCIONES ILUSTRADAS

- 1**

Permita que la bolsa de KWIK-STIK™ alcance la temperatura ambiente sin abrirla. Abra la bolsa a la altura de la muesca y quite la unidad KWIK-STIK™.
- 2**

Desprenda la parte despegable de la etiqueta y sujétela a la placa de cultivo primario o al registro de control de calidad. No desmonte el dispositivo durante la hidratación.
- 3**

Sobre el borde de la mesa o el banco de trabajo, triture la ampolla en la parte superior del KWIK-STIK™ (justo debajo del menisco del líquido) para liberar el líquido hidratante. Rompa la ampolla solo una vez. Si la rompe varias veces puede hacer que fragmentos de vidrio perforen la carcasa de plástico, y crear así un riesgo de lesiones.
- 4**

Sostenga verticalmente y golpee sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido a través del eje hacia la parte inferior de la unidad donde está contenida la microesfera. No agite el KWIK-STIK™ y no cubra el pequeño orificio de ventilación de la parte superior del KWIK-STIK™.
- 5**

Pellizque la parte inferior de la unidad y triture la microesfera en el líquido hasta que este se haya disuelto.
- 6**

A continuación, sature de forma abundante el hisopo con el material hidratado y transfiera al medio de agar apropiado o utilice de acuerdo con el POE del laboratorio. Una vez hidratado, utilícelo de inmediato.
- 7**

Inocule la(s) placa(s) de cultivo primario haciendo rodar suavemente el hisopo sobre un tercio de la placa.
- 8**

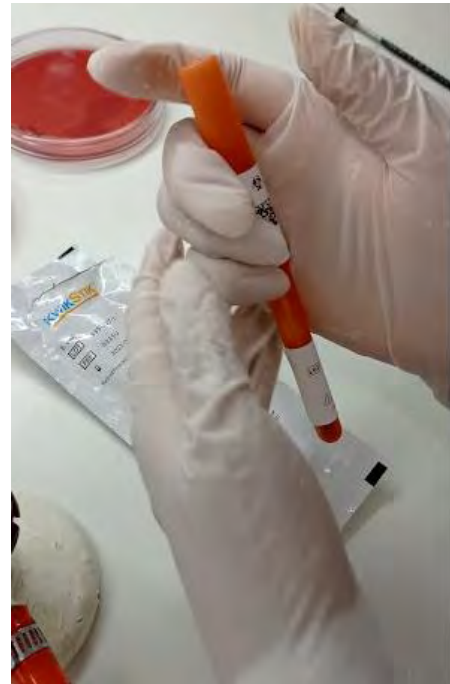
Mediante un bucle estéril, estríe para facilitar el aislamiento de colonias.
- 9**

Deseche el KWIK-STIK™ mediante la eliminación adecuada de riesgos biológicos.
- 10**

Inmediatamente incube la(s) placa(s) invertida(s) de cultivo primario inoculado a temperatura y condiciones apropiadas para el microorganismo.

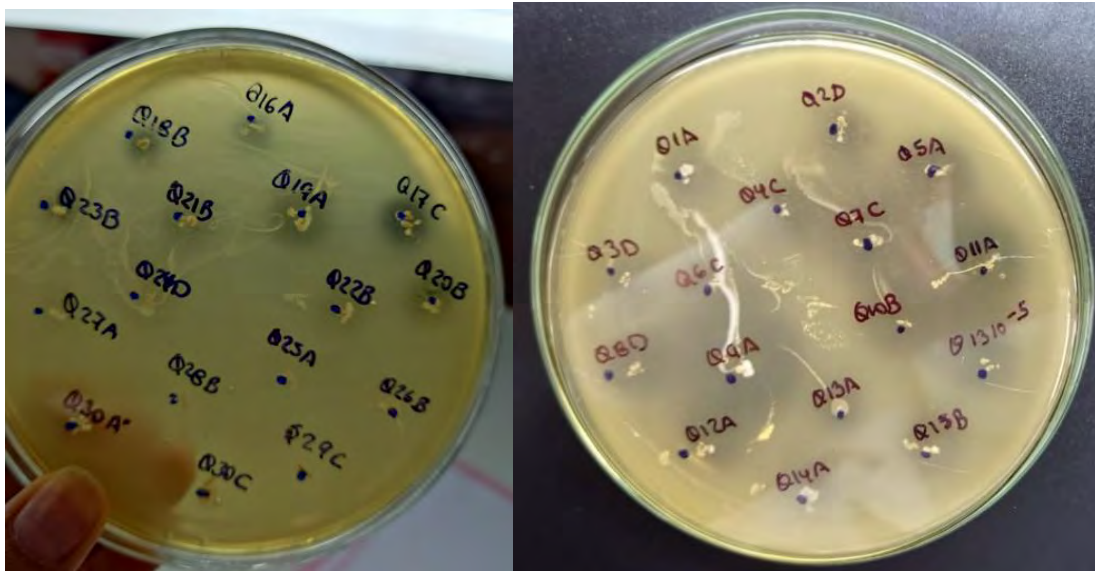
El método de cultivo se puede encontrar en la página del producto en [microbiologics.com](http://microbiologics.com)





Cultivo de cepas ATCC en medios diferenciales; agar MacConkey para *E. coli* 25922 y agar manitol salado para *S. aureus* 25923

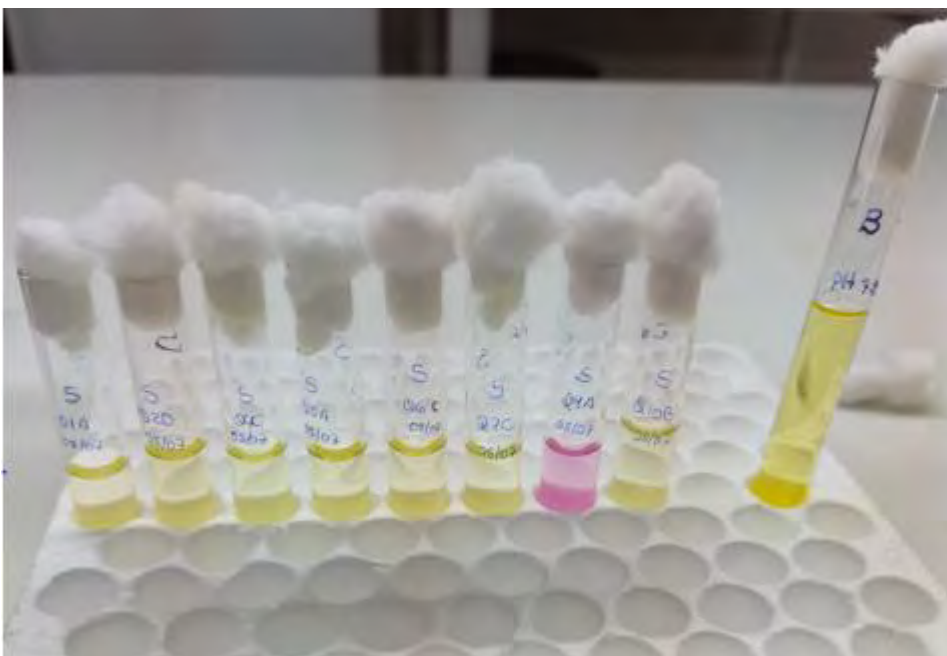
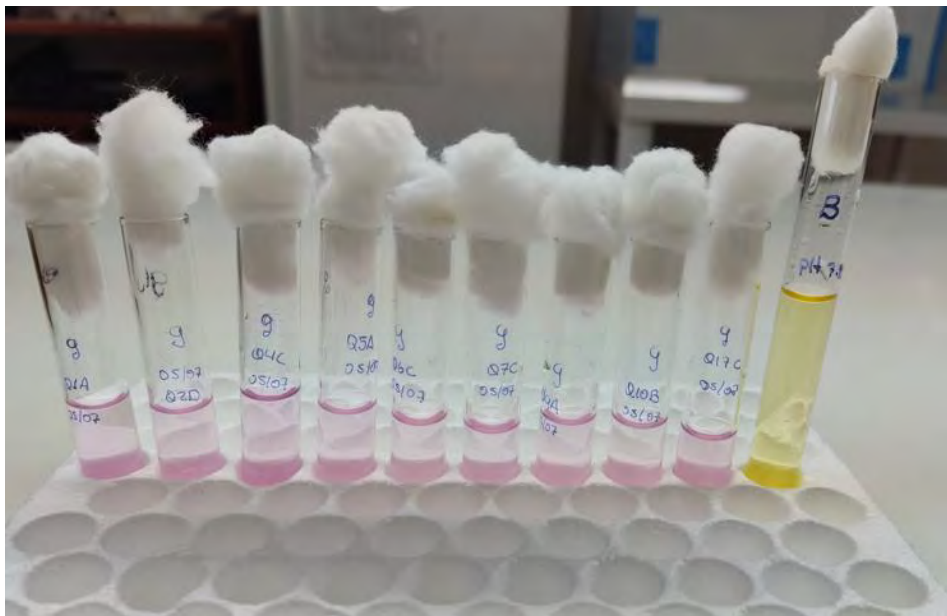
## ANEXO 6

**SELECCIÓN DE CEPAS CON EFECTO BACTERICIDA POR EL MÉTODO DE PICADA (Zamora, 2003)**

Observación de halos de inhibición por el método de picada.

## ANEXO 7

### IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS DE *Lactobacillus* sp.



Pruebas bioquímicas, asimilación de carbohidratos

## ANEXO 8

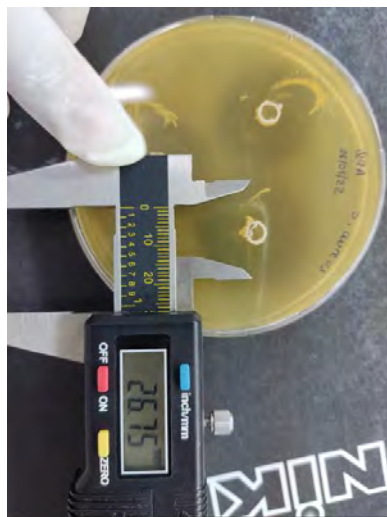
### EFFECTO BACTERICIDA POR EL MÉTODO DE KIRBY BAUER MODIFICADA



Ejecución de los pocillos para inoculación

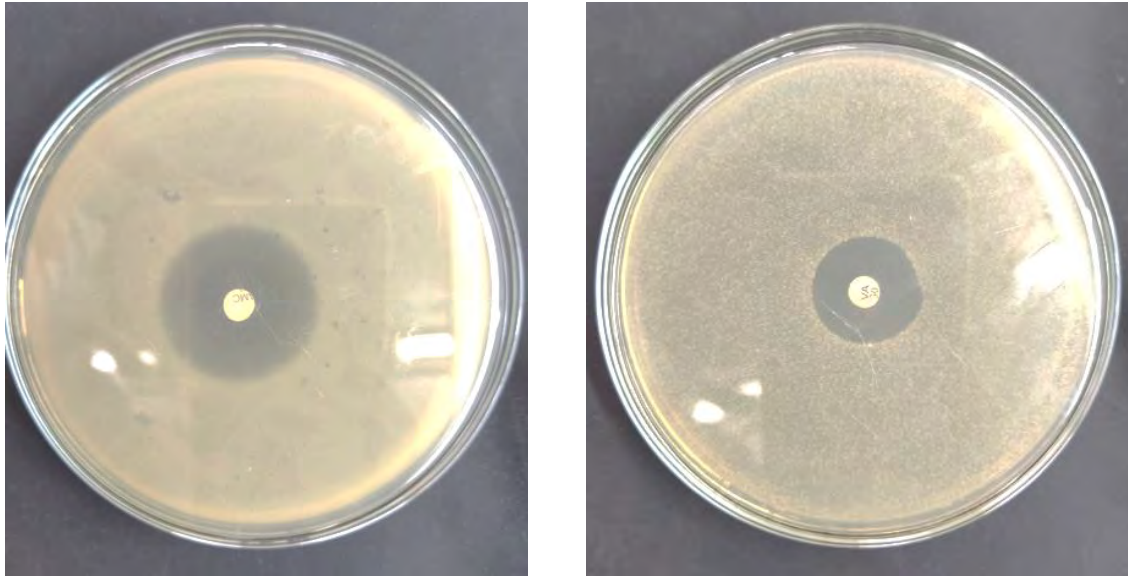


Producción de halos de inhibición

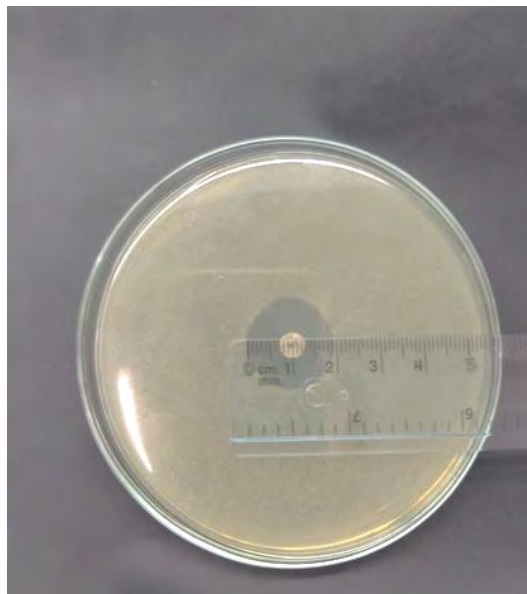


Medición del diámetro de halos de inhibición de *Lactobacillus* sp. frente a *E. coli* y *S. aureus*





Observación de halos de inhibición



Producción y medida de halos de inhibición de ATB frente a *E. coli* y *S. aureus*

## ANEXO 9

### CINÉTICA DE CRECIMIENTO



Cultivo de cepas



Lectura de absorbancias