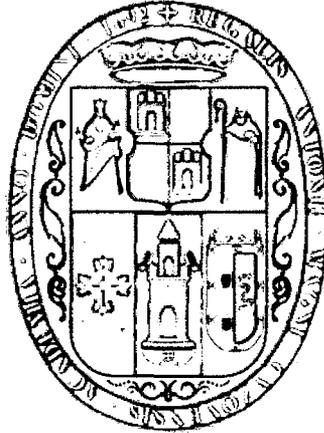


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO
ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE BACTERIAS ÁCIDO
LÁCTICAS AISLADAS DE QUESO FRESCO
ARTESANAL FRENTE A *Listeria monocytogenes* y
*Escherichia coli***

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO
PROFESIONAL DE BIÓLOGO**

PRESENTADA POR:

Br. LISSETH PAMELA PERALTA CANCHIS

ASESORA:

M.Sc. LUZ MARINA PONCE ARANÍBAR

CUSCO-PERÚ

2014

TESIS FINANCIADA POR LA UNSAAC

DEDICATORIA

«Quien desee ver el arco iris, debe aprender a disfrutar de la lluvia»

A Edu, mi ÁNGEL DE LA GUARDA, estas en mi corazón y en cada uno de mis pensamientos.

A mamá y papá, Thelma y Leonardo, por estar conmigo siempre brindándome todo su amor y apoyo incondicional.

A mi adorada, única e irremplazable hermana, Karencita, por saber comprender, tolerarme y alegrar mis días grises con sus locuras y alegría infinita.

A mis abuelos Alicia y Guillermo, y a mi tía Susy, porque con su ejemplo me enseñan a seguir adelante pase lo que pase

Los amo infinitamente.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por el amor que me demuestra día a día en cada una de las vivencias y personas que pones en mi vida.

*Es muy poco decir "gracias infinitas" a mi asesora **M.Sc. Luz Marina Ponce Aranibar** por compartir sus conocimientos, su paciencia, disposición, comprensión, inmenso cariño y sobre todo por ser el pilar fundamental en la culminación de esta etapa de mi vida profesional, por haberme permitido aprender no solo sobre Biología, sino también por enseñarme como ser una mejor persona.*

A la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco por el apoyo económico brindado, así mismo a los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, por los conocimientos ofrecidos durante mi formación profesional.

A Yahanda Apaza Castillo, por jugársela por mí y ayudarme de manera incondicional y estar conmigo cuando más la necesitaba.

A mis amigos y amigas Marita, Arianna, Raúl, Wilian, Duber, Sergio y mi Matias por siempre tener una palabra de aliento, por su paciencia, por saber cómo reconfortarme en momentos difíciles y ayudarme en este proceso. Los llevaré en mi corazón, cuenten conmigo siempre..

CONTENIDO

RESUMEN	i
INTRODUCCION	ii
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	iv
JUSTIFICACIÓN	vi
HIPOTESIS	vii
OBJETIVOS	viii

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES	1
1.2 GENERALIDADES	4
1.2.1 QUESO FRESCO	4
1.2.2 BACTERIAS ACIDO LACTICAS	4
1.2.3 CLASIFICACIÓN Y GÉNEROS REPRESENTATIVOS	8
1.2.4 MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN ALIMENTOS	21
1.2.5 LISTERIA MONOCYTOGENES	22
1.2.6 ESCHERICHIA COLI	24
1.2.7 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	25

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDIO	31
2.2 MATERIALES	31
2.3 METODOLOGIA	35
2.3.1 Muestreo y toma de muestra	35
2.3.2 Recuento y aislamiento de bacterias ácido lácticas	35
2.3.3 Selección y purificación de bacterias ácido lácticas	36
2.3.4 Congelación de cepas puras de bacterias ácido lácticas	37
2.3.5 Determinación " <i>in vitro</i> " de la actividad antagónica por el método de difusión en agar	37
2.3.5 Identificación de las cepas con actividad antagónica	38
2.3.6 Influencia del pH, temperatura, tiempo de almacenamiento	

sobre el efecto antagónico de los cultivos libres de células	40
2.3.7 Verificación de la termoresistencia	41
2.3.8 Análisis de datos	41

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 AISLAMIENTO Y RECuento DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	42
3.2 ACCIÓN ANTAGÓNICA DE LOS CULTIVOS LIBRES DE CÉLULAS DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS	46
3.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS	46
3.4 INFLUENCIA DEL pH SOBRE EL EFECTO ANTAGÓNICO DE LOS CULTIVOS LIBRES DE CÉLULAS DE BAL	53
3.5 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE EL EFECTO ANTAGÓNICO DE LOS CULTIVOS LIBRES DE CÉLULAS	60
3.6 TERMORESISTENCIA DE LOS CULTIVOS LIBRES DE CÉLULAS	71
CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES	75
LITERATURA CONSULTADA	76
ANEXOS	86

CUADROS

1. Bacterias Ácido Lácticas Homofermentativas y Heterofermentativas	8
2. <i>Lactobacillus</i> productores de bacteriocinas	9
3. Bacteriocinas y microorganismos productores.	17
4. Componentes activos de la galería API 50 CH.	28
5. Recuento de BAL (log ufc/g) en queso fresco a un día de elaboración.	42
6. Recuento de BAL (log ufc/g) en queso fresco a dos días de elaboración.	42
7. Estadísticos descriptivos del recuento de BAL	43
8. Perfiles de fermentación de <i>Lactobacillus plantarum</i>	47
9. Perfiles de fermentación de <i>Lactobacillus brevis</i>	48
10. Perfiles de fermentación de <i>Lactobacillus pentosus</i>	49
11. Perfil de fermentación de <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	50
12. ANOVA para la influencia del pH en la actividad antagónica de cultivos libres de células de BAL frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	55
13. Prueba de Tukey B para la influencia del pH en la actividad antagónica de cultivos libres de células de BAL frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	55
14. ANOVA para la influencia del pH en la actividad antagónica de cultivos libres de células de BAL frente a <i>Escherichia coli</i>	57
15. Prueba de Tukey para la influencia del pH en la actividad antagónica de cultivos libres de células de BAL frente a <i>Escherichia coli</i>	57
16. ANOVA para la influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento de los sobrenadantes libres de células BAL en la actividad antagónica frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	65
17. Prueba de Tukey para influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento de los sobrenadantes libres de células de BAL en la actividad antagónica frente a <i>Listeria monocytogenes</i> .	66
18. ANOVA para la influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento de los sobrenadantes libres de células de BAL en la actividad antagónica frente a <i>Escherichia coli</i> .	69
19. Prueba de Tukey para influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento de los sobrenadantes libres de células de BAL en la actividad antagónica frente a <i>Escherichia coli</i> .	70

GRÁFICOS

Gráfico 1. Mapa de ubicación de la Comunidad de Haparquilla-Anta	32
Gráfico 2. Sistema de identificación API 50 CHL.	40
Gráfico 3. <i>Lactobacillus plantarum</i> frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	53
Gráfico 4. <i>Lactobacillus brevis</i> frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	53
Gráfico 5. <i>Lactobacillus pentosus</i> frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	54
Gráfico 6. <i>Lactobacillus plantarum</i> frente a <i>Escherichia coli</i>	56
Gráfico 7. <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> frente a <i>Escherichia coli</i>	56
Gráfico 8. <i>Lactobacillus plantarum</i> frente a <i>Listeria monocytogenes</i> a -20°C.	60
Gráfico 9. <i>Lactobacillus brevis</i> frente a <i>Listeria monocytogenes</i> a -20°C.	60
Gráfico 10. <i>Lactobacillus pentosus</i> frente a <i>Listeria monocytogenes</i> a -20°C.	61
Gráfico 11. <i>Lactobacillus plantarum</i> frente a <i>Listeria monocytogenes</i> a 4°C.	61
Gráfico 13. <i>Lactobacillus pentosus</i> frente a <i>Listeria monocytogenes</i> a 4° C.	62
Gráfico 12. <i>Lactobacillus brevis</i> frente a <i>Listeria monocytogenes</i> a 4°C.	62
Gráfico 14. <i>Lactobacillus plantarum</i> frente a <i>Listeria monocytogenes</i> a 25°C.	63
Gráfico 15. <i>Lactobacillus brevis</i> frente a <i>Listeria monocytogenes</i> a 25°C.	64
Gráfico 16. <i>Lactobacillus pentosus</i> frente a <i>Listeria monocytogenes</i> a 25° C.	64
Gráfico 17. <i>Lactobacillus plantarum</i> frente a <i>Escherichia coli</i> a -20°C.	66
Gráfico 18. <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> a -20°C	67
Gráfico 19. <i>Lactobacillus plantarum</i> frente a <i>Escherichia coli</i> a 4°C.	67
Gráfico 20. <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> a 4°C.	68
Gráfico 21. <i>Lactobacillus plantarum</i> frente a <i>Escherichia coli</i> a 25°C.	68
Gráfico 22. <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> a 25°C	69

RESUMEN

La capacidad antagónica que poseen las bacterias ácido lácticas (BAL) y su uso en la preservación y conservación de alimentos, viene tomando gran interés e importancia en los últimos años pues los metabolitos producidos por estas bacterias han demostrado tener control sobre gran variedad de microorganismos patógenos y alterantes de alimentos.

Para el presente trabajo de investigación, entre los meses de septiembre y noviembre del 2013 se tomaron muestras de quesos frescos de elaboración artesanal en la comunidad Campesina de Haparquilla - Anta para demostrar la actividad antagónica de las bacterias ácido lácticas aisladas de los mismos frente a *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*.

De las 75 cepas aisladas y cuya actividad antagónica fue probada mediante la metodología de "difusión en agar", se observó que 10 presentaron actividad antagónica importante de las cuales *Lactobacillus plantarum* (5 cepas) mostró antagonismo frente a ambos patógenos, *Lactobacillus brevis* (2 cepas) y *Lactobacillus pentosus* (2 cepas) fueron antagónicas frente a *Listeria monocytogenes* mientras que *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (1 cepa) tuvo actividad antagónica frente a *Escherichia coli*. Las diez cepas de bacterias ácido lácticas aisladas en estudio fueron identificadas mediante la prueba bioquímica API 50 CH (bioMeriux).

Los cultivos libres de células de las cepas identificadas, fueron sometidos a diferentes pHs (4.0, 6.5 y 8.0). En cada pH se sometieron a diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento (-20°C, 4°C Y 25°C) (8,15 y 30 días). Se observó que a temperaturas de congelación y refrigeración la actividad antagónica era mucho mejor que a 25°C; mientras que a los 8 y 15 días de almacenamiento mostraron la misma actividad; pero a los 30 días se observó disminución marcada de la actividad aunque no fue anulada.

Además, se observó que las cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis* ssp *lactis* presentaron termoresistencia a 121°C.

INTRODUCCION

Se denominan "bacterias ácido lácticas" (BAL) al grupo de bacterias Gram positivas no esporuladas que fermentan azúcares como glucosa y lactosa para producir ácido láctico. Dentro de este grupo se reconoce la existencia de microorganismos anaerobios aerotolerantes. Los géneros representativos de las BAL son: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y *Pediococcus* (Torres, 2002)

Estos microorganismos se pueden clasificar además por su metabolismo, en homofermentativos y heterofermentativos, los primeros producen exclusivamente ácido láctico, mientras que los otros, producen además ácido acético, etanol y dióxido de carbono (Torres, 2002).

Durante cientos de años las bacterias ácido lácticas (BAL) han desempeñado un papel importante en la obtención y producción de la mayor parte de los alimentos fermentados que actualmente se consumen. Las BAL no sólo son interesantes en la industria alimentaria por inducir características organolépticas y estructurales favorables, sino también por inhibir el desarrollo de microorganismos no deseables, alterantes y patógenos, lo que sugiere la posibilidad de utilizarlos para extender la vida útil e incrementar la calidad higiénica de los alimentos. (Piard y Desmazeud, 1992).

Actualmente las BAL son adicionadas intencionalmente como cultivos iniciadores en productos lácteos, cárnicos, panadería, vegetales, en bebidas alcohólicas, y son utilizadas como probióticos, los cuales se definen como cepas de microorganismos vivos que al ser ingeridos ejercen un efecto positivo en la salud del consumidor, con la ventaja de proporcionar estabilidad y calidad al producto final. (Leroy y col., 2002; Soomro, 2004)

El desarrollo de las BAL en los alimentos propicia un acentuado ambiente hostil para el crecimiento y sobrevivencia de otras bacterias, principalmente las patógenas. Los efectos inhibitorios y destructivos no sólo son el resultado de una acidificación del medio, sino que intervienen otros mecanismos, entre ellos la producción de peróxido de hidrógeno, antibióticos, ácidos grasos, agotamiento de nutrientes, lo que provoca un aumento en la vida de anaquel de los productos y las bacteriocinas que pueden considerarse como conservadores naturales en algunos alimentos; estos compuestos las hacen

capaces de inhibir una gran variedad de microorganismos contaminantes, patógenos y/o deterioradores como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Listeria* y *Streptococcus*. (Piard y Desmazeud, 1992; Schillinger y col., 1996).

El aumento en el consumo de alimentos procesados que se elaboran con conservadores químicos, ha originado en los consumidores una demanda por alimentos con un mínimo procesamiento y que tiendan a ser más naturales. Como resultado de este patrón en el consumo, existe un gran interés en la utilización de agentes antimicrobianos producidos naturalmente además de esto, las BAL pueden ser utilizadas como cultivos iniciadores en los procesos fermentativos permitiendo obtener productos con la propiedad deseada e incluso pueden reducir o reemplazar, el empleo de algunos aditivos químicos, ofreciendo alimentos atractivos para el consumidor actual. (Leroy y col., 2002; Soomro, 2004)

Por lo expuesto, el presente estudio tiene como objetivo principal evaluar la actividad antagónica de bacterias ácido lácticas aisladas de quesos frescos elaborados artesanalmente, frente a *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*;

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, se han identificado serios problemas relacionados directamente con las limitadas formas de conservación de los alimentos, sumado al hecho de la continua exigencia de disminuir y prohibir cada vez más el uso de preservantes y aditivos químicos en los mismos, debido a los efectos adversos que pueden causar en la salud del consumidor. Esto obliga a la búsqueda de metodologías alternativas para conservarlos.

La biopreservación es un método de conservación que ofrece diversas condiciones para extender la vida útil y aumentar la seguridad de los alimentos, por medio del uso de una microbiota natural o controlada y de sus productos antimicrobianos.

Diferentes estudios han aplicado la biopreservación mediante el uso de una microbiota natural como las Bacterias Acido Lácticas (BAL) aisladas de productos lácteos, cárnicos, pescados y vegetales, utilizando sus propiedades antibacterianas atribuidas a los productos finales de su metabolismo como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, diacetaldehído, reuterina y bacteriocinas.

¿Tendrán las bacterias ácido lácticas aisladas de queso fresco artesanal la capacidad antagónica para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*?

JUSTIFICACIÓN

El hombre a lo largo de la historia, se ha preocupado por conservar los alimentos ya sea por medio de métodos físicos, como el calentamiento, la deshidratación, la irradiación, la congelación, o por métodos químicos como la adición sustancias tales como ácido sórbico, sorbato sódico, sorbato de potasio, entre otros; con el fin de causar la muerte de los microorganismos o inhibir su crecimiento (Madrid, 1996). Por esta razón, la industria de alimentos utiliza conservantes químicos con capacidades bactericidas como los sulfatos y los nitritos; sin embargo, estos bactericidas presentan ciertos riesgos, ya que al estar presentes en la mayoría de los alimentos pueden sobrepasar el límite de ingesta diaria y llegar a ser tóxicos, ocasionando enfermedades degenerativas en el sistema metabólico como el cáncer (Herrera, 2009).

La tendencia actual de la población está inclinada a consumir alimentos sin aditivos o que contengan aditivos naturales, eliminando el empleo de conservantes químicos en determinados alimentos y utilizando solo refrigeración como mecanismo primario de conservación, esto supone un riesgo potencial para el consumidor, especialmente si se considera la posibilidad de que se rompa la cadena de frío durante el proceso, la manipulación, la distribución y el almacenamiento de este tipo de productos (Casaus, 1998).

El queso fresco de elaboración artesanal, al no pasar por un proceso de maduración prolongado y no contener cultivos lácteos iniciadores, constituye una fuente natural de bacterias ácido lácticas provenientes de la flora microbiana natural presente en la leche utilizada como materia prima.

Los ácidos orgánicos producidos por las bacterias ácido lácticas, con la consiguiente reducción en el pH, se consideran como el principal agente inhibidor del crecimiento de microorganismos contaminantes en los alimentos; además, producen agentes antimicrobianos como son bacteriocinas, etanol, reuterina y otros metabolitos de importancia industrial que pueden evitar el crecimiento de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, bacteria patógena frecuentemente transmitida por alimentos entre los que figuran los productos lácteos y los zumos de fruta no pasteurizados, la carne elaborada y cocida de

manera insuficiente, la fruta y las hortalizas crudas y la manipulación y el almacenamiento insalubre de los alimentos preparados.

Asimismo se ha logrado inhibir microorganismos patógenos emergentes *Listeria monocytogenes*, que se desarrolla a temperaturas habituales de refrigeración de los alimentos y es causante de listeriosis en los seres humanos (Joerger, 2003), ahonda el interés y la preocupación por mantener el control durante el proceso y manejo de los alimentos con el fin de garantizar su inocuidad.

Éstos son organismos (o grupos) que advierten oportunamente de un manejo inadecuado o contaminación que incrementan el riesgo de presencia de microorganismos patógenos en alimentos, son responsables de brotes de infecciones e intoxicaciones a nivel mundial constituyendo así un problema de salud pública que podría ser evitado gracias a la capacidad antibacteriana que presentan las BAL al evitar el desarrollo de microorganismos deterioradores y/o patógenos, razón que ha motivado la investigación acerca de este tema.

Para que la adición de las bacteriocinas en los alimentos sea efectiva, estas deben conservar sus propiedades bajo los tratamientos que reciba dicho alimento. Para ello será necesario establecer el comportamiento de las mismas en relación a los siguientes parámetros: sensibilidad al Ph (estables a pHs neutros o cercanos a la neutralidad), sensibilidad a los cambios de temperatura (desde la congelación, refrigeración y temperatura superior a la del ambiente) y tolerancia al calor (para que no sufran alteraciones con los tratamientos térmicos a los cuales son sometidos ciertos alimentos)

Por lo expuesto, la presente investigación contribuye al conocimiento de la fisiología de las bacterias ácido lácticas para su uso potencial como conservantes naturales en los alimentos.

HIPOTESIS

“Las bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de queso fresco artesanal, tienen acción antagónica frente a Listeria monocytogenes y Escherichia coli.”

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de bacterias ácido lácticas aisladas de queso fresco elaborado artesanalmente en la comunidad campesina de Haparquilla-Anta, frente a *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Aislar e identificar las cepas de bacterias ácido lácticas que presenten mejor actividad antagónica mediante la prueba bioquímica API-50 CH.
2. Determinar la acción antagónica *in vitro* de los cultivos libres de células de las bacterias ácido lácticas aisladas frente a *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*.
3. Determinar la influencia del pH, temperatura y tiempo de almacenamiento de los cultivos libres de células de las bacterias ácido lácticas sobre su capacidad antagónica frente a *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*.
4. Determinar la termoresistencia de los metabolitos responsables del antagonismo de los cultivos libres de células de BAL.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES

- **Alvarado C. y col. 2010 (Venezuela).** Realizaron un estudio de la capacidad antagónica de 6 cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas del pastizal de una finca lechera e identificadas con los números 1, 4, 20, 37, 50, y 58, se evaluó el antagonismo de cada cepa contra *Salmonella enteritidis* CVCM 446, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi* aislada de leche cruda de una finca local y *Listeria monocytogenes*. Con la técnica de difusión en pocillos, se probaron sobrenadantes de las cepas sometidos a neutralización con NaOH 1N, exposición a 32 µg/ml de peroxidasa, tratamiento con 2 mg/ml de tripsina y calentamiento a 120 °C por 20 minutos, con respectivos controles posteriores de actividad antagónica residual. *L. plantarum* 1, 4, 20, 37 exhibieron actividad antagónica contra *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes* con halos de inhibición de 9-11 mm debido a la presencia de ácidos orgánicos. No pudo determinarse la naturaleza de los compuestos del sobrenadante de *L. plantarum* 37 activos contra *Salmonella typhi*; mientras que la actividad antagónica de *L. plantarum* 58 contra *Listeria monocytogenes* evidenciada por halos de 18 mm se perdió con el tratamiento de tripsina, pero no fue afectada por el calor, lo que parece indicar la presencia de molécula(s) de naturaleza proteica estable(s) al calor.
- **Concha P. 2010 (Chile).** Un total de 432 cepas de BAL, aisladas a partir de 90 muestras de vegetales frescos, fueron analizadas para determinar su actividad antagónica contra *Listeria monocytogenes*. Sólo 7 (1.62%) cepas aisladas presentaron actividad contra *Listeria monocytogenes*, la cual fue atribuida principalmente a la producción de compuestos similares a bacteriocinas, ya que los cultivos libres de células mantuvieron su actividad anti-listeria después de ser neutralizados y tratados con catalasa o con tripsina, pero fue totalmente inactivada al ser tratados con proteinasa K. Las 7 cepas de BAL-bacteriocinogénicas fueron identificadas en base a sus propiedades fenotípicas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. El espectro de la actividad de los compuestos antibacterianos presentes en los cultivos libres de células de

las 7 cepas fue muy reducido, limitándose exclusivamente al género *Listeria* spp. Ninguno presentó actividad contra otras bacterias patógenas ensayadas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella* Enteritidis y *Yersinia enterocolitica*).

- **Cristobal R. 2008 (Perú).** Recolecto 33 muestras de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias y se aislaron 341 cepas de lactobacilos. Las especies de lactobacilos aisladas con mayor frecuencia fueron *Lactobacillus casei* 56 % (191) y *Lactobacillus plantarum* 35.8 % (122). Sólo el 16.42 % (56/341) de los aislados presentaron actividad bacteriocinogénica frente a *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Los sobrenadantes de los cultivos bacteriocinogénicos se ajustaron el pH a 6.5 para descartar la acción de ácidos orgánicos. Por otro lado, los sobrenadantes fueron sometidos a tratamientos térmicos de 60, 80 y 100 °C, a pH 4, 7 y 9, y a temperaturas de conservación de 4, 15 y 32 °C y se encontró que la termoestabilidad fue de 60 a 80 °C, el pH óptimo de 4 a 7 y la temperatura óptima de conservación de 4 a 32 °C. Las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes de los diferentes aislados inhibieron el crecimiento de cepas de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella sonnei* y *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, *Listeria innocua* fue resistente. El aislado identificado como *Lactobacillus plantarum* produjo la bacteriocina con los mejores parámetros fisicoquímicos experimentados y además presentó un amplio espectro de inhibición contra los microorganismos indicadores evaluados.

- **Del Campo M. y col. 2008 (México).** Aislaron 350 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL), a partir de 35 muestras de quesos frescos, fueron probadas en contra de cuatro microorganismos patógenos, tres Gram+ (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) y un Gram- (*Salmonella agona*). Sólo 25 cepas mostraron capacidad antagónica, el mayor efecto inhibitorio fue debido al pH, por la producción de ácidos orgánicos. 8 de ellas, mostraron un efecto inhibitorio diferente al pH, Todas las cepas mostraron actividad antagónica en contra de bacterias Gram+. *S. agona*, no fue inhibida en su desarrollo, por ninguna de las cepas de bacterias ácido lácticas. Tres

cepas que mostraron inhibición con el sobrenadante, se trataron con enzimas proteolíticas, y se determinó que el factor inhibidor es de origen proteico. 16 cepas mostraron que es necesaria la presencia de las BAL para inhibir a los patógenos, al probar el sobrenadante libre de BAL, el efecto inhibidor no se manifestó.

- **Estrada A. y col. 2005 (México).** Trabajaron con dos cepas nativas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*, aisladas de productos fermentados; estas crecen en medios de cultivo y producen un extracto complejo de ácidos orgánicos y péptidos con actividad bactericida. Los extractos de estas cepas mostraron capacidad bactericida frente a *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*. Los ensayos para determinar su acción se realizaron con el extracto crudo y centrifugado provenientes de cada una de las cepas, a diferentes tiempos de almacenamiento, temperatura y pH. Se observó una mejor actividad antibacteriana y estabilidad de la actividad, en el extracto crudo almacenado a temperatura de 0°C y 4°C. A pH 5,5 se presentó la mejor actividad en los dos extractos frente a las cepas de estudio. Se concluyó que los extractos sintetizados por ambas cepas tienen un alto potencial bactericida contra estas dos patógenos que son responsables de toxiinfecciones alimentarias.

- **Ramirez M. y col. 2005 (México).** Evaluaron la presencia de bacterias ácido-lácticas (BAL) en 33 muestras de quesos elaborados artesanalmente en el Estado de Hidalgo a través de método de difusión en pocillos, obteniendo así más de 300 cepas. El espectro de actividad de estas cepas fue evaluado tanto frente a bacterias Gram positivas como contra Gram negativas. Las BAL fueron capaces de inhibir el crecimiento de varios de los patógenos probados, siendo las cepas de *Vibrio cholerae* las más sensibles, mientras que *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Citrobacter* y *Proteus* fueron las más resistentes, y destacando así mismo la inhibición contra *Listeria monocytogenes*. La actividad antimicrobiana de los compuestos producidos por las bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas podrían utilizarse como un conservador potencial para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos.

1.2 GENERALIDADES

1.2.1 QUESO FRESCO

La Norma Técnica Peruana (NTP) 202.195, define queso fresco (tradicional), como el queso blando, no madurado ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, sin cultivos lácteos, obtenido por separación del suero después de la coagulación de la leche pasteurizada, entera, descremada o parcialmente descremada, o una mezcla de algunos de estos productos.

Los quesos frescos tienen un alto contenido de humedad y no han sufrido proceso de maduración, por lo que pueden tener sabor a leche fresca o leche acidificada. Su consistencia suele ser pastosa y su color blanco. Por tener un alto contenido de humedad en la pasta (45-80%), su tiempo de vida útil resulta corto, debiendo ser consumidos en pocos días. Su transporte y conservación se debe hacer a temperaturas de 4-10°C; aun manteniendo la cadena de frío son altamente perecederos (Madrid, 1996; Villegas, 2009, citados por Álvarez 2011).

Los quesos se encuentran entre los mejores alimentos del hombre siendo una variedad ampliamente producida en los países de Latinoamérica por la sencillez del procesamiento, su costo más bajo y el rendimiento mayor al obtenido en comparación con otras variedades (Inda, 2000, citado por Álvarez 2011).

1.2.2 BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas se utilizan desde hace aproximadamente 4 mil años en la elaboración de alimentos. Su uso más común está relacionado con la producción de queso, yogurt, crema de leche y mantequilla. Su distribución en la naturaleza es amplia así como en nuestro sistema digestivo. Sus aplicaciones más conocidas están relacionadas con la industria láctea pero también pueden presentar otros usos como en el curado de la carne, pescado y embutido (Mossel y col. 2003)

Las bacterias ácido lácticas tienen actualmente un gran potencial biotecnológico en la producción de alimentos destinados al consumo humano y animal. No sólo contribuyen al desarrollo de características organolépticas de

los alimentos sino que sirven para el control de la proliferación de microorganismos patógenos debido a que producen bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, ácido láctico y otras sustancias. Entre éstas, se ha comprobado que los lactobacilos son beneficiosos para la salud humana y animal, por tal motivo estas bacterias pueden ser usadas en la conservación de ciertos alimentos usando las bacteriocinas como antimicrobianos. embutido (Mossel y col. 2003)

1.2.2.1 CARACTERES GENERALES

Las BAL son un grupo de bacterias inmóviles Gram-positivas, no esporuladas, con forma de cocos o bacilos, catalasa y oxidasa-negativas. Fermentan carbohidratos con producción de ácido láctico como producto principal o único del metabolismo de las hexosas, tolerantes a los ácidos; se desarrollan a pH bajos algunas pueden desarrollarse desde pH 3.2 hasta 9.6, pero la mayoría crece entre 4.0 y 4.5. Son bacterias mesófilas, aunque algunas son capaces de crecer a temperaturas tan bajas como 5°C y otras a temperaturas tan altas como a 45°C, generalmente su temperatura óptima se encuentra entre 25°C y 30°C. No realizan fosforilación acoplada a cadena transportadora de electrones y obtienen su energía por fosforilación oxidativa a nivel de sustrato mientras oxidan los carbohidratos, no tienen un ciclo de Krebs funcional (Madigan y col.2001).

Las BAL son anaerobias aerotolerantes, es decir que pueden crecer con o sin presencia de oxígeno. Algunas cepas son capaces de tomar oxígeno por medio de sistemas de flavoproteína oxidasa, produciendo peróxido de hidrógeno por medio de enzimas alternativas llamadas peroxidases. No se forma ATP en la reacción flavoproteína oxidasa, pero el sistema oxidasa puede emplearse para la reoxidación de nicotidamida adenin dinucleotido reducido (NADH). (Madigan y col., 2001).

Otra característica en común de éstas bacterias, es que se encuentran frecuentemente en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas concentraciones de oxígeno como por ejemplo, la leche y productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, ensilados, pescado y derivados de la pesca (Stiles, 1997;

Cintas y col, 2001). Además, algunas BAL son habitantes comunes del tracto gastrointestinal y mucosas del hombre y animales (Cintas y col., 2001).

Son muy exigentes en su nutrición nitrogenada y vitamínica; sólo pueden crecer en medios ricos en vitaminas, bases nitrogenadas y fuentes de carbono; así, el medio debe aportar una mezcla compleja de las vitaminas B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas (Charles, 1998).

Entre las propiedades fisiológicas de este grupo de bacterias destacan algunas de aplicación tecnológica, como son: la resistencia a bacteriófagos (importante problema a la hora de obtener cultivos iniciadores su actividad proteolítica (importante en la curación del queso), fermentación de lactosa y citratos (responsables del aroma de numerosos productos frescos), producción de polisacáridos (importantes al conferir textura a determinados alimentos), su alta resistencia a la congelación y liofilización (importante en la conservación de fermentos comerciales como ya se ha indicado), su capacidad de adhesión a la mucosa digestiva (de ahí uno de sus usos como probióticos) y la producción de sustancias antimicrobianas (con acción preventiva de intoxicaciones alimentarias) (Wigley, 1999),

1.2.2.2 METABOLISMO

La energía celular de las BAL procede de la fermentación de los carbohidratos para producir ácido láctico. Para llevar a cabo esta fermentación utilizan dos vías diferentes para la glucólisis: el esquema de Embden – Meyerhof - Parnas (EMP), con generación casi exclusiva de ácido láctico y la vía 6-fosfogluconato/fosfocetolasa, de la que resultan otros productos finales como etanol, ácido acético y dióxido de carbono.

Esencialmente, en las BAL el metabolismo de los carbohidratos puede ser clasificado como: homofermentativo, heterofermentativo y heterofermentativo facultativos. Las BAL pueden formar ácido láctico D(-) o L(+) o una mezcla racémica de los dos isómeros (Lyhs, 2002).

Las bacterias homofermentativas poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, pero carecen de fosfocetolasa. Se caracterizan por la capacidad de transformar la glucosa por la vía EMP, para producir dos moléculas de lactato por una molécula de glucosa. En algunos casos se transforma la fructosa para obtener ácido láctico, con producción nula o mínima de otros productos

secundarios. Las bacterias homolácticas son capaces de extraer de una determinada cantidad de glucosa aproximadamente el doble de energía con respecto a las bacterias heterolácticas. Dentro de esta clasificación se encuentran los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* (Casp y Requena, 1999).

Las bacterias heterofermentativas no tienen fructosa-difosfato-aldolasa pero tienen fosfoacetolasa y por lo tanto degradan la glucosa por la vía llamada de pentosas fosfatos o de las hexosas fosfatos; a partir de las hexosas producen cantidades equimolares de ácido láctico, ácido acético, etanol, y dióxido de carbono, y degradan las pentosas para obtener ácido acético y ácido láctico. Dentro de este grupo se clasifican todas las especies de *Leuconostoc*, *Weissella* y *Carnobacterium* así como alguna del género *Lactobacillus*. Las bacterias heterolácticas son más importantes que las homolácticas desde el punto de vista de la producción de componentes de aroma y sabor, tales como acetaldehído y el diacetilo (Casp y Requena, 1999; Lyhs, 2002).

Existen también las bacterias heterofermentativas facultativas, las cuales utilizan la vía EMP o la vía de las pentosas fosfato para dar como productos en su mayoría ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono, ácido fórmico y etanol. Las bacterias heterofermentativas facultativas fermentan hexosas para producir ácido láctico por la vía de EMP o para ácido láctico, etanol, ácido acético y ácido fórmico. Las pentosas son fermentadas para producir ácido láctico y ácido acético a partir de la vía del 6 P-gluconato (Lyhs, 2002; Vandamme y col., 1996).

Cuadro1. Bacterias Ácido Lácticas Homofermentativas y Heterofermentativas

HOMOFERMENTATIVAS	HETEROFERMENTATIVAS	HETEROFERMENTATIVAS FACULTATIVAS
Lactobacillus: <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus.</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. jensenii</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>lactis</i> <i>Lb. farciminis</i> <i>Lb. salivarius</i> subesp <i>salivarius</i> <i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. Gallinarium</i>	Lactobacillus: <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. hilgardii</i> <i>Lb. sanfrancisco</i> <i>Lb. trichodes</i> <i>Lb. fructivorans</i> <i>Lb. collinoides</i> <i>Lb. kefir</i> <i>Lb. maleferementans</i>	Lactobacillus: <i>Lb. acetotolerans</i> <i>Lb. hamsteri</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. coryniformis</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sake</i> <i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. pentosus</i> <i>Lb. alimentarius</i> <i>Lb. agilis</i>
Pediococcus: <i>P. damnosus</i> <i>P. dextranicum</i> <i>P. parvulus</i> Streptococcus: <i>S. bovis</i> <i>S. thermophilus</i> Lactococcus: <i>L. lactis</i> subesp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> subesp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> subesp. <i>hordmiae</i> <i>L. garviae</i> <i>L. plantarum</i> Vagococcus: <i>V. fluvialis</i> <i>V. salmoninarum</i>	Leuconostoc: <i>Lc. amelibiosum</i> <i>Lc. argentinum</i> <i>Lc. lactis</i> <i>Lc. mesenteroides</i> <i>Lc. gelidum</i> Carnobacterium: <i>C. divergens</i> <i>C. mobile</i> <i>C. gallinarum</i> <i>C. piscicola</i> Weissella: <i>W. confusus</i> <i>W. paramesenteroides</i> <i>W. confusus</i> <i>W. halotolerans</i> <i>W. minor</i> <i>W. viridescens</i>	Pediococcus: <i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>P. damnosus</i> <i>P. dextranicus</i> <i>P. inopinatus</i>

Fuente: Stiles y Holzalpfel 1997

1.2.3 CLASIFICACION Y GENEROS REPRESENTATIVOS

Al tratarse de un grupo heterogéneo, las BAL están representadas por varios géneros de importancia.

Los géneros que se describen brevemente a continuación son los que tienen mayor relevancia en la microbiología de los alimentos.

A) Género *Lactobacillus*.- Comprende diversas bacterias que tienen en común su habilidad para producir ácido láctico como producto principal, son Gram positivas y no forman esporas. Son anaerobios facultativos y su crecimiento óptimo se da entre 30 y 40°C, aunque pueden crecer en temperaturas en un rango de 5 a 53°C. El pH óptimo de crecimiento está en pH 5.5 – 5.8, pero en general crecen a pH <5. El género incluye cerca de 25 especies y su principal criterio de diferenciación se basa en la composición del producto final de la fermentación. En la industria alimentaria son muy útiles en la producción de alimentos fermentados como yogurt, pan, pepinillos y olivas, entre otros, con el fin de contribuir a la preservación, valor nutricional y sabor (Batt, 2000).

Otra característica del género *Lactobacillus* es la capacidad para producir bacteriocinas; algunos ejemplos de bacteriocinas producidas por este tipo de microorganismos se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. *Lactobacillus* productores de bacteriocinas

BACTERIOCINA	PRODUCTOR	ORGANISMOS SENSIBLES
Lactacina	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i>
Lactacina F	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> .	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
Brevicina 37	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Pediococcus damnosus</i>
Lacticina A	<i>Lactobacillus delbruecki</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
Helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Sakacina A	<i>Lactobacillus sake</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Plantaricina A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
Gassericina A	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>

Fuente: González y col 2003.

Kandler y Weiss agrupan a los lactobacilos en tres grupos tradicionales:

- Grupo I, lactobacilos homofermentativos obligados, fermentan hexosas casi exclusivamente a ácido láctico por la vía Embden Meyerhoff, pero no pentosas ni gluconato. Ejemplo: *Lactobacillus. delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*.
- Grupo II, lactobacilos heterofermentativos facultativos, fermentan hexosas casi exclusivamente a ácido láctico por vía Embden Meyerhoff o, al menos por algunas especies, hasta ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico bajo limitantes de glucosa. También pueden fermentar pentosas hasta ácido láctico y ácido acético por vía fosfoctolasa. Ejemplo: *Lactobacillus. casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. sake*.
- Grupo III, lactobacilos heterofermentativos obligados, fermentan hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono (CO₂). También fermentan pentosas hasta ácido láctico y ácido acético. Ejemplo: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*.

B) Género *Lactococcus*.- Los miembros del género de los *Lactococcus* son bacterias Gram positivas y según sus condiciones de crecimiento pueden tener un tamaño entre 0.5 – 1.5 µm, no forman esporas y no tienen movilidad. Tienen un metabolismo homofermentativo y producen grandes cantidades de ácido láctico.

Su crecimiento óptimo se da a los 25°C y pueden crecer en temperaturas bajas hasta los 10°C. (Batt, 2000).

El género *Lactococcus* es útil en la fabricación de productos de consumo alimenticio diario. Algunos como *Lactococcus. lactis*, *Lactococcuslactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus. cremoris* se usan a diario como fermentos en la producción de derivados lácteos. Además pueden ayudar a preservar los productos con la producción de bacteriocinas. De éstas bacteriocinas, la más estudiada es la nisina, que es producida por *Lactococcus lactis* (Batt, 2000).

C) Género *Streptococcus*.- Son cocos esféricos u ovoides de 0.8-1.2 µm, típicamente dispuestos en pares o en cadenas, y son anaerobios facultativos. Tienen la característica de ser homofermentativos, transformando la lactosa a ácido láctico. Son más sensibles al oxígeno y poseen una considerable

actividad superóxido dismutasa. Estas bacterias tienen en general una completa necesidad de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y piridimicas. Ésta es una de las razones por las que abundan en un medio rico como la leche (Casp y Requena, 1999; Charles, 1998).

Los más conocidos son *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*, los cuales son responsables de la acidificación de la leche, y el *Streptococcus diacetylactis* que produce también la fermentación del ácido cítrico a diacetilo, sustancia característica del aroma de la mantequilla. Es también importante el *Streptococcus thermophilus* que se desarrolla bien a 40-45°C, por lo que se emplea para conseguir la acidificación del yogur durante su maduración a 45°C y para la maduración de los quesos de pasta cocida (Casp y Requena, 1999).

D) Género *Leuconostoc*.- Comprende bacterias Gram positivas no esporuladas.

Crecen en anaerobiosis o aerobiosis. Como los otros grupos de BAL necesitan un medio de crecimiento complejo, rico en aminoácidos, péptidos, carbohidratos, vitaminas e iones metálicos. Por lo general son células esféricas semejantes a bacilos muy cortos con extremos redondeados (Funel, 1999).

Alrededor del 12% de las BAL aisladas de muchos ecosistemas, en la gran mayoría de material vegetal, son especies de *Leuconostoc*. Algunas son aisladas de la superficie de vegetales y frutos y otras de carnes refrigeradas y productos lácteos. Como otras especies de BAL el género *Leuconostoc* es tecnológicamente interesante en la industria de comidas y bebidas. Además cepas como *Leuconostoc carnosum* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* producen leucocina A, una bacteriocina que tienen efecto antimicrobiano comprobado contra la *Listeria spp.* (Funel, 1999).

IMPORTANCIA DE LAS BAL

a) Cultivos iniciadores.- Se define como aquel cultivo formado por una o varias cepas de bacterias activas, capaces de multiplicarse en un alimento para propiciar la acidificación rápida del medio donde producen cambios específicos en el aroma, sabor, textura, cuerpo, acidez, humedad, digestibilidad y aspecto de los alimentos. Se utilizan para la elaboración de productos como col agria,

embutidos (como el salami y chorizo), productos lácteos y bebidas alcohólicas, (Mossel y col., 2003; Madrid, 1996).

Las bacterias que se emplean como cultivos iniciadores en quesos pertenecen principalmente a los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, los cuales se adicionan para producir la acidificación adecuada para las temperaturas de fabricación, lo que permite controlar y frenar el desarrollo de la flora microbiana presente en la leche y desciende el pH favoreciendo la actividad de coagulante del cuajo. La elección del cultivo iniciador determina el sabor, aroma y textura de la cuajada (Early, 2000).

b) Probióticos.- Son cultivos simples o mixtos de microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud del consumidor. La forma más frecuente de consumir probióticos es a través de alimentos lácteos (Soomro y col., 2004).

Dentro de los efectos benéficos que se han atribuido a estos microorganismos se incluyen:

- Mejoría en las enfermedades infecciosas.
- Mejoría en enfermedades crónicas intestinales como colitis ulcerosa
- Reducción del colesterol sérico.
- Mejora en la absorción del calcio.
- Producción de enzimas útiles en la predigestión de proteínas, carbohidratos y lípidos de la leche, lo que permite a un individuo con intolerancia a la lactosa consumir leche o productos derivados.
- Contribución a la prevención de cáncer colointestinal (Soomro y col., 2004).

Estos efectos pueden deberse directa o indirectamente a la regulación de la microflora intestinal o de la respuesta inmunológica. Entre las bacterias probióticas utilizadas para el consumo humano se encuentran las BAL, que incluyen a las siguientes cepas: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* subesp. *rhánnosus*, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (González y col., 2003; Soomro y col., 2004)

c) **Deterioro de los alimentos.**- En cuanto a los aspectos negativos, las BAL están implicadas en la descomposición o deterioro de la carne, las verduras, vinos, la leche y otros productos de consumo diario, originando cambios en la composición de algunos alimentos y provocar un mal sabor, olores desagradables, acidez y turbidez. Algunos son el agriado en productos lácteos, frutas y alimentos perecederos, espesamiento en productos que contienen líquidos azucarados (almíbares), mucosidad y enverdecimiento de embutidos (Fernández, 2000).

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE LAS BAL

Los principales mecanismos de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas son, la competencia por nutrientes y la formación de ácido láctico y ácido acético, con el consiguiente descenso del pH (Piard & Desmazeud, 1992; Trias y col, 2008) Además, producen otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno, ácido benzoico, reuterina y bacteriocinas (Piard & Desmazeud, 1992; Bari y col., 2005; Settanni & Corsetti, 2008). Sin embargo, de todos los antimicrobianos producidos por las BAL, las bacteriocinas han adquirido cada vez mayor atención (Ogunbanwo y col, 2003; Noonpakdee y col., 2003; Campos y col., 2006; Allende et al 2007; Trias y col., 2008; Randazzo y col., 2009).

A continuación se describen estos compuestos:

- **Ácidos orgánicos.** Debido a la fermentación de la glucosa y otras hexosas, se produce ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético y etanol. Una vez que son sintetizados se liberan al medio extracelular donde valores bajos de pH (< 4), inhiben o retardan el crecimiento de microorganismos patógenos o alterantes como *E. coli*, *Salmonella spp*, *S. aureus*, esporas de hongos y levaduras (Salminen y col., 2004).

- **Peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno.**- Como el desarrollo de las BAL se lleva a cabo en un medio aerobio, se producen metabolitos del oxígeno como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^-), todos ellos producidos durante el proceso de

reducción del oxígeno hasta agua durante la respiración. Estos metabolitos tienen un efecto antimicrobiano principalmente por la inactivación de enzimas como: gliceraldehído-3P- deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa o coenzima A, por la oxidación de los grupos sulfidrilo. La inhibición también puede ser causada por el aumento de la permeabilidad de las membranas debido a la peroxidación de los lípidos y a daños en el material genético (Madigan y col., 2001).

Algunas BAL pueden producir H₂O₂, que contribuye a la actividad inhibitoria contra otros microorganismos, incluidos los patógenos presentes en alimentos (Gilliland, 1977). El H₂O₂ imita el efecto de las bacteriocinas, por eso su efecto antimicrobiano debe ser excluido para comprobar el poder bactericida de las bacteriocinas (Tagg, 1971).

- **Dióxido de carbono.-** Como consecuencia de un proceso heterofermentativo de hidratos de carbono, las BAL producen dióxido de carbono, que puede crear condiciones anaeróbicas e inhibir el crecimiento de microorganismos aerobios obligados o formar ácido carbónico y causar un descenso de pH (Salminen y col., 2004).

- **Diacetilo.-** Una vez que se sintetiza, en la vía de degradación del piruvato, se libera al medio extracelular donde además de formar algunos aromas de productos fermentados, tiene un efecto antimicrobiano contra bacterias, hongos y levaduras, posiblemente por la inactivación de enzimas (Salminen y col., 2004).

- **Acetaldehído.-** Es producido por *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* por acción de la treonina-aldolasa, la cual rompe la treonina produciendo acetaldehído y glicina. Como las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* no pueden metabolizar el aldehído cuando se encuentran en productos como el yogurt, éste se concentra en el producto aproximadamente en 25 ppm. El acetaldehído en concentraciones de 10 – 100 ppm inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* en productos lácteos (Piard y col.1992).

Bacteriocinas.- El término bacteriocina ha sufrido varias definiciones desde que Gratia descubrió en 1925 las colicinas. Actualmente, la definición más aceptada es la de Jack y col., (1995): “productos de síntesis ribosómica, bien primarios o modificados, que son secretados extracelularmente y presentan un espectro de acción bactericida relativamente estrecho.” En general, las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas, tales como las BAL, a diferencia de aquellas producidas por las Gram negativas, presentan un espectro antimicrobiano mucho más amplio, que afecta incluso a géneros taxonómicamente no relacionados (Jack y col., 1995).

Se ha puesto especial interés en las bacteriocinas, las cuales son objeto de investigación por su actividad antimicrobiana contra las bacterias de los alimentos tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* entre otros (Davidson y Hoover, 1993).

Las bacteriocinas son identificadas como proteínas biológicamente activas contra miembros de su misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora (Klaenhammer, 1999).

Se denominan bacteriocinas a las moléculas que responden a los cinco criterios siguientes (Klaenhammer, 1999).

- Tiene un espectro de acción limitado; sólo las especies taxonómicamente próximas a la cepa productora pueden ser inhibidas. Sin embargo, recientemente este concepto se ha modificado ya que se ha demostrado también el efecto bactericida contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora.

- Son bactericidas

- Para actuar la bacteriocina se fija sobre un receptor específico localizado sobre sitios “blanco”

- La célula productora sintetiza igualmente una molécula que la inmuniza contra su propia bacteriocina

Dentro de las bacteriocinas, se encuentra la nisina, aislada, caracterizada y denominada por Mattick y Hirsch en 1947 producida por especies de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos inhibiendo el desarrollo de bacterias Gram positivas especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria*. Siendo la nisina la única bacteriocina reconocida por la FDA

con la categoría GRAS "Generally Recognized as Safe" (Davidson y Hoover, 1993).

Una ventaja importante de las bacteriocinas sobre los antibióticos clásicos es que las enzimas digestivas las destruyen (pueden romperse fácilmente por medio de proteasas y son rápidamente inactivadas en el estómago y en el intestino delgado); este hecho indica que la ingesta de estos compuestos no alterará la ecología del tracto digestivo y tampoco esto causará riesgos relacionados al uso de antibióticos comunes (Davidson y Hoover, 1993).

CLASIFICACIÓN

Diversos investigadores han buscado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genética. Algunos ejemplos de bacteriocinas se mencionan en el cuadro 3. La clasificación de estos compuestos fue propuesta por Ness en 1996 en base en las características bioquímicas y genéticas (González y col. 2003).

Clase I. Lantibióticos.- Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, β -metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina.

Clase II. No lantibióticos.- Son bacteriocinas de peso molecular variable, que contienen aminoácidos regulares. En este grupo se pueden identificar tres subclases:

Clase II-A.- Son péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal YGNGV (Y, tirosina, G, glicina, N, asparagina y V, valina), denominada secuencia consenso, y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.

Clase II-B.- Son formadores de complejos de poración que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad

antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantarinas EF y JK.

Clase II-C.- Son péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

Clase III.- Son péptidos grandes mayores de 30 kDa, en esta clase se encuentran las helveticinas J y V, acidofilicina A, lactacinas A y B.

Cuadro 3. Bacteriocinas y microorganismos productores

BACTERIOCINA	CLASE	MICROORGANISMO PRODUCTOR
Nisina	I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Pediocina PA-1	II A	<i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE92
Pediocina JD	II A	<i>Pediococcus acidilactici</i> JD1-23
Sakacina A	II A	<i>Lactobacillus sake</i> 706
Sakacina P	II A	<i>Lactobacillus sake</i> LTH673
Curvacina A	II A	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174
Mesentericina	II A	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Plantaricina E/F	II B	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11
Lactococcina A	II B	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Lactococcina B	II B	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4
Lactacina F	II B	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Divergicina	II C	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13
Helveticina	III	<i>Lactobacillus helveticus</i>

Fuente: González y col., 2003

Mecanismos de Acción.- Las bacteriocinas actúan sobre la membrana celular del microorganismo sensible, rompiendo la permeabilidad de la membrana citoplasmática, incrementando la permeabilidad de pequeños compuestos (K⁺, Na⁺, Cl⁻), haciendo que las células no sean capaces de proteger al citoplasma

Las células no sean capaces de proteger al citoplasma del medio ambiente, llevando a la inhibición celular.

Se conocen dos tipos de modos de acción principalmente:

1. *Formación de poros*: los monómeros de bacteriocina enlazados se insertan y polimerizan en la membrana citoplasmática para formar un poro con los residuos hidrofílicos en la cara interior y los hidrofóbicos en la cara exterior (Abee y col., 1994; Chikindas y col., 1993).
2. *Efecto detergente*: las bacteriocinas hacen más permeable a la membrana, aumentando la interacción en ésta con el medio ambiente permitiendo la liberación de iones, enzimas y ATP (Chikindas y col., 1993).

Aplicaciones de bacteriocinas en alimentos. Un amplio rango de bacteriocinas producidas por BAL han sido investigadas intensamente permitiendo su caracterización química detallada (Roos y col., 1999). Debido a que las BAL han sido usadas por siglos para alimentos fermentados, se consideran como seguras por la FDA (Food and drug administration) de Estados Unidos y esto permite su uso en la fermentación de alimentos sin una aprobación adicional. La nisina fue la primer bacteriocina en ser aislada y aprobada para ser usada en alimentos específicamente para prevenir el brote de esporas de *Clostridium botulinum* en quesos distribuidos en Inglaterra (Chung, 2003).

El uso de nisina tiene una larga historia y actualmente es empleada como conservante seguro de alimentos en alrededor de 48 países diferentes siendo aprobada por la FDA en 1988 (Roos y col., 1999). La atención de los investigadores de bacteriocinas se enfocó en la bacteria *Listeria monocytogenes*, agente causal de listeriosis, ya que la frecuencia de brotes de esta infección aumentó combinada con la resistencia natural del agente causal. Además, el estudio de esta bacteria fue interesante debido a su capacidad de crecer a temperaturas cercanas a la refrigeración que se utilizan para la preservación tradicional de alimentos. Esto condujo al aislamiento de un gran número de bacteriocinas de clase IIa, las cuales son altamente activas contra *L. monocytogenes* (Ennahar, 2000).

Las bacteriocinas también han sido usadas en carne curada, leche, queso y pasta de soya (Riley, 2002). Se ha desarrollado gelatina de pediocina, una

bacteriocina de clase IIa producida por bacterias productoras de ácido láctico, que protege a las comidas rápidas de la contaminación bacteriana (Raloff, 1998). Una cepa productora de pediocina también ha sido adicionada a embutidos y se ha encontrado una reducción del número de bacterias unas 10.000 veces respecto al número en embutidos no tratados. Además la pediocina activa fue encontrada en los embutidos dos meses después de la refrigeración. Otro ejemplo de una bacteriocina que podría usarse en la industria alimenticia es la piscicolina, una bacteriocina producida por *Carnobacterium piscicola* otra bacteria productora de ácido láctico. La piscicolina ya ha sido patentada y pronto será usada en productos cárnicos (Raloff, 1998).

Requisitos generales y aspectos reglamentarios del uso de una bacteriocina como conservante natural

Las aplicaciones potenciales de las bacteriocinas en alimentos se ven limitadas por sus propiedades individuales, como son el espectro de inhibición, su estabilidad al calor, solubilidad, etc. En general, para que una bacteriocina pueda ser aplicada en alimentos debe cumplir los siguientes requisitos (Holzapfel y col., 1995):

- La cepa productora debe tener estatus GRAS (Generally Recognized As Safe)
- La bacteriocina debe presentar un amplio espectro de inhibición frente a los principales patógenos transmitidos por alimentos o ser altamente específica sobre alguno de ellos.
- La bacteriocina debe ser termoestable.
- No debe presentar riesgo alguno para la salud
- Tener efectos beneficiosos sobre el producto, mejorando su seguridad, y no afectando a su calidad nutricional y propiedades organolépticas.

Yang y Ray en 1994 establecieron que para que una bacteriocina sea aceptada como aditivo alimentario debe de haber pasado por una serie de estudios en los que se haya establecido:

- El espectro inhibidor
- Las características bioquímicas y genéticas de la cepa productora y de la bacteriocina.

- La sensibilidad de la bacteriocina a los cambios de pH y temperatura.
- Los factores que afectan su producción.
- El proceso de purificación.
- El coste de la adición de la bacteriocina a los alimentos.

Es obvio que para que la adición de bacteriocinas a los alimentos sea efectiva, éstas deben conservar sus propiedades bajo los tratamientos que reciba dicho alimento. Para ello es necesario establecer el comportamiento de las mismas en relación a los siguientes parámetros:

- Sensibilidad al pH: la industria alimentaria demanda bacteriocinas que sean estables a pHs neutros porque una gran variedad de bacterias patógenas se desarrollan en estas condiciones y la mayoría de los alimentos que requieren conservantes poseen pHs próximos a la neutralidad.
- Sensibilidad a proteasas: dada su naturaleza proteica, la mayoría de las bacteriocinas son sensibles a estas enzimas, lo que facilita su degradación una vez que son ingeridas evitándose así que lleguen a ocasionar trastornos intestinales.
- Tolerancia al calor: una de las características de las bacteriocinas producidas por las BAL es su tolerancia al calor, por lo que no sufren alteraciones con los tratamientos térmicos que se aplican a ciertos alimentos.

Factores que limitan la eficacia de las bacteriocinas en los alimentos.- No obstante, la producción y eficacia de las bacteriocinas de las BAL puede verse limitada por varios factores que deben ser tenidos en cuenta a la hora de abordar el estudio de la aplicación potencial de cualquier bacteriocina:

a) En relación a la producción (Schillinger y col., 1996)

- Que el ambiente (pH, temperatura, nutrientes, etc.) sea inadecuado para su producción en el alimento.
- Que ocurra la pérdida espontánea de la capacidad productora de bacteriocina.
- Que la cepa productora sea inactivada por infección por fagos.
- Que la cepa productora sufra antagonismo por otros microorganismos presentes en los alimentos.

b) En relación a la **eficacia** (Schillinger y col., 1996)

- Que se desarrollen patógenos o bacterias deterioradoras resistentes a la bacteriocina.
- Que concurren condiciones que desestabilicen su actividad biológica.
- Que se adhiera a los componentes de los alimentos tales como las partículas de grasa.
- Que sea inactivada o antagonizada por otros aditivos.
- Que sea poco soluble y/o se distribuya irregularmente en la matriz del alimento.
- Que el pH del alimento tenga efecto negativo sobre la estabilidad, la solubilidad y la actividad de la bacteriocina.

1.2.4 MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN ALIMENTOS

En los alimentos ocasionalmente se encuentran microorganismos patógenos para el hombre y los animales. Su consumo puede ocasionar un proceso infeccioso cuando el microorganismo es ingerido viable y en número suficiente en el alimento, seguido del crecimiento del mismo por la invasión de los tejidos, o bien por la ingestión de una toxina ya presente o elaborada tras su multiplicación en el alimento originando una intoxicación (Fernández, 2000).

Las enfermedades producidas por el consumo de alimentos se pueden clasificar en:

- **Infecciones:** Son aquellas en las que los microorganismos no necesariamente se multiplican en el alimento, sino que el alimento sólo actúa como vehículo, siendo este el caso para bacterias, virus y parásitos que se multiplican e invaden el intestino ocasionando enfermedades como shigelosis, gastroenteritis, fiebre tifoidea, disentería bacilar, hepatitis A y amibiasis.

- **Toxi-infecciones:** Son producidas por la ingestión de alimentos con agentes patógenos que al multiplicarse en el intestino producen toxinas o sustancias tóxicas, en este tipo de enfermedades se incluyen las especies de *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*. (Frazier y Westhoff, 2000).

- **Intoxicación:** Puede ser consecuencia de un envenenamiento químico o de la ingestión de una toxina, los síntomas se producen después de la ingestión

de los alimentos contaminados con la toxina. Los microorganismos se multiplican en alimento y forman la toxina. Las toxinas generadas en el alimento pueden estar asociadas a las células microbianas o pueden ser liberadas de ellas.

Las enfermedades transmitidas por alimentos se asocian a prácticas higiénicas deficientes y al consumo de agua o por alimentos contaminados (Prescott y col., 1999).

1.2.5 LISTERIA MONOCYTOGENES

Las especies de *Listeria* son bacilos cortos Gram positivos no esporulados, de 1.2 x 0.5 μm , a veces es cocoide y corineforme por mostrar diploformas dispuestas en "V"; las células también aparecen aisladas. Son anaerobios facultativos, a temperatura de entre 20-25°C son móviles por medio de flagelos peritricos, pero a 37°C sólo forman un flagelo polar. La temperatura óptima de crecimiento es 30 – 37°, pero puede proliferar en un amplio espectro de temperaturas entre 1 a 45°. (Vazquez-Boland, 2001)

Son organismos psicrótrofos, capaces de crecer a temperaturas de refrigeración. El crecimiento de las cepas es inhibido a valores de pH inferiores a 5.5 pero el pH mínimo de crecimiento se encuentra entre 4.4 y 5.6 (Frazier y Westhoff, 2000).

Algunos estudios sugieren que entre el 1 y 10% de los seres humanos pueden ser portadores intestinales de *L. monocytogenes*. Esta bacteria se ha encontrado en por lo menos 37 especies diferentes de mamíferos, tanto domésticos como salvajes, además de en 17 especies de aves y en algunas especies de pescados y mariscos.

Puede ser aislada del suelo, del forraje ensilado y de otras fuentes ambientales. *L. monocytogenes* es altamente resistente a los efectos de la congelación, el secado y el calentamiento. Esta última característica es especialmente notoria ya que se trata de una bacteria que no forma esporas (www.cfsan.fda.gov, 2005).

Listeria monocytogenes ha sido asociada con alimentos tales como la leche cruda, la leche líquida supuestamente (o erróneamente) pasteurizada, los quesos (en especial las variedades que han sufrido un corto período de maduración), el helado, los vegetales crudos, las salchichas de carne cruda

fermentada, las aves de corral crudas y cocidas, las carnes crudas (de todo tipo) y el pescado fresco o ahumado. Su capacidad de crecer a temperaturas tan bajas como los 3°C permite su multiplicación en los alimentos refrigerados. (Adams y Moss, 1998).

La bacteria puede ocasionar una infección conocida como listeriosis, que ha emergido como una de las principales enfermedades transmitidas por alimentos a finales del siglo XX. Aunque su incidencia es baja, es de indudable importancia en salud pública debido a diversas circunstancias: la gravedad de los síntomas no entéricos (meningitis, septicemia y aborto), la alta mortalidad de sus infecciones (20-30%) (Batt, 2000), el largo periodo de incubación, el elevado riesgo que representa para niños pequeños, especialmente neonatos, mujeres embarazadas, ancianos e individuos inmunocomprometidos su ubicuidad y, finalmente su resistencia a condiciones ambientales adversas (bajo pH, alta concentración de NaCl, baja temperatura). La dosis infecciosa del germen es desconocida pero se cree que varía con la tensión y la susceptibilidad de la persona. De los casos reportados, asociados con el consumo de leche cruda o pasteurizada menos de 1000 organismos totales pueden causar la enfermedad. También se desconoce su mecanismo de patogenicidad, sin embargo, hay que considerar tanto la sobrevivencia y multiplicación del microorganismo dentro del huésped, como en el proceso invasivo del tejido implicado (Scientific Status Summary, 2004).

• CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Dominio: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Listeriaceae

Género: Listeria

Especie: *Listeria monocytogenes*

Fuente: Garrity G. (2005)

1.2.6 ESCHERICHIA COLI

Taxonómicamente las bacterias de la especie *Escherichia coli* pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos cortos, gram negativos, quimioheterotrofos, catalasa positiva, oxidasa negativa, anaerobios facultativos. Produce ácido y gas a partir de la glucosa, lactosa, fructosa, galactosa, maltosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y manitol. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar (Dos santos, 2007).

Son organismos mesófilos que crece a temperaturas desde 7- 10°C, con una temperatura óptima de 37°C. Además son capaces de resistir el almacenamiento en refrigeración o en congelación por tiempos prolongados (Adams y Moss, 1998).

La mayoría de las cepas pertenecientes a la especie *Escherichia coli*, forman parte de la microflora normal del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, encontrándose habitualmente en las heces. Es por ello que su presencia en los alimentos es índice de contaminación fecal y señala un peligro potencial de posibles patógenos entéricos.

En la leche es una situación diferente, esta bacteria eventualmente existe en residuos de suciedad sobre el equipo mal saneado que contiene la leche ya tratada térmicamente. Su hallazgo en los alimentos puede establecerse como el indicador más confiable de contaminación fecal, especialmente en aquellos que han recibido un tratamiento antimicrobiano severo (Fernández, 2000).

• CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma-proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*

Fuente: Garrity G. (2005)

1.2.7 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Para el análisis de bacterias ácido lácticas se ha recurrido a la determinación de características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, que permiten establecer la identidad de un microorganismo. Sin embargo estas técnicas no proporcionan suficiente información, requieren de mucho tiempo para el análisis y además confían en características visuales subjetivas. No obstante, el intenso y extraordinario avance de la biología en los últimos años, ha permitido desarrollar nuevos métodos de identificación que facilitan y aportan mayor precisión a la clasificación taxonómica.

Los métodos tradicionales de identificación se basan en el estudio de aspectos fenotípicos y fisiológicos de la población. Por lo general, la identificación comienza con el examen morfológico de las colonias aisladas en medios sólidos. El estudio continúa con el examen microscópico de un extendido de los microorganismos aislados, coloreados según la técnica de Gram. A partir de aquí se inoculan las pruebas bioquímicas tradicionales, donde se requieren cultivos puros del microorganismo en cuestión para obtener una biomasa suficiente capaz de evidenciar los cambios en las pruebas utilizadas como son: sistemas indicadores de pH, formación o degradación de determinadas sustancias y actividades enzimáticas (Nieto y col., 2004).

La identificación fenotípica a nivel de género y especie, se basa en las siguientes características fisiológicas y bioquímicas (Alais, 1980):

- Crecimiento a diferentes temperaturas (10, 37, 45°C).
- Tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (2, 4, 6.5 %).
- Sobrevivencia al tratamiento térmico (63 y 65°C)
- Fermentación de carbohidratos, principalmente: fructosa, glucosa, galactosa, arabinosa, trehalosa, ramnosa, maltosa, rafinosa, manosa, xilosa, dextrosa, amigdalina, celobiosa, melecitosa, melibiosa, ribosa, salicina, sorbitol y sacarosa.
- Producción de acetoina.
- Hidrólisis de esculina.

Sin embargo, estos métodos involucran una gran cantidad de material, medios de cultivo y tiempo; por tal motivo están cayendo en desuso, ya que, a pesar de que pueden dar información muy amplia, no son prácticos pues resultan ser

susceptibles de modificarse cuando las condiciones ambientales varían (Alais, 1980):

- **MICROMÉTODOS**

Los métodos microbiológicos tradicionales son laboriosos y lentos, esto ha provocado el desarrollo de métodos rápidos, fiables y menos costosos para detectar e identificar microorganismos. Las pruebas bioquímicas y enzimáticas se han utilizado desde el comienzo de la bacteriología para estudiar la actividad metabólica y así poder identificar los diferentes microorganismos. A través de los años, han comenzado a utilizarse sistemas miniaturizados de identificación que consisten en galerías con sustratos para evidenciar en forma clara una determinada actividad metabólica. (Manual API, bioMérieux, Inc, Francia)

Todos los micrométodos de identificación comerciales están basados en una de cinco tecnologías diferentes o una combinación de ellas. Estos incluyen, reacciones para identificar cambios de pH que requieren de 15 a 24 h de incubación; evidenciar reacciones enzimáticas que requieren 2 a 4 h; identificar fuentes de carbono, detección visual de crecimiento bacterial, o la detección de ácidos grasos vía cromatografía de gas. Estos métodos presentan tres ventajas importantes frente a las técnicas convencionales: posibilidad de determinar varias actividades enzimáticas fáciles de realizar y manejar, además de requerir menos material y equipamiento (Entis y col., 2001; O'Hara y col., 2003). Actualmente existen diversos sistemas miniaturizados de diagnóstico; tales como el sistema miniaturizado de diagnóstico API (bioMérieux, Inc., Francia) que es un sistema estandarizado para la identificación de diferentes grupos bacterianos. Consiste en una plantilla con microtubos conteniendo medios de cultivo deshidratados que se reconstituyen al agregar una suspensión bacteriana. Permite la realización de varias pruebas bioquímicas a partir de una única suspensión bacteriana y se hablará de este más adelante. (Manual API, bioMérieux, Inc, Francia)

SISTEMA API 50 CH™

Es un sistema estandarizado, que asocia 49 pruebas bioquímicas para estudiar el metabolismo de carbohidratos de los microorganismos. API 50 CH™ (bioMérieux) es usado en conjunto con API 50 CHL™ medium (bioMérieux)

para la identificación de *Lactobacillus* y géneros relacionados. Este método consiste en una plantilla con 50 microtubos con los sustratos que serán fermentados por cierto microorganismo; los sustratos son, en su mayoría, carbohidratos y/o derivados (heterosidos, polialcoholes, ácidos urónicos). Las pruebas de fermentación son inoculadas con medio API 50 CHL™ (bioMérieux) de composición similar al caldo MRS pero sin glucosa, citrato de amonio y con púrpura de bromocresol o con medio API 50 CHB/E™ (bioMérieux), que rehidratan los sustratos. Durante la incubación, la fermentación es evidenciada por un cambio en el color del microtubo, causada por la producción anaerobia de ácido que origina el vire del indicador de pH en el medio. El primer microtubo, que no contiene ningún ingrediente activo, es usado como un control negativo. El medio empleado en la inoculación de las plantillas dependerá del metabolismo y las exigencias nutricionales del grupo microbiano a ser probado. El API 50 CH™ (bioMérieux, Inc.) es usado para observar dos actividades metabólicas: La oxidación que es visible por un cambio en el color del cultivo, causada por la producción de ácido y el vire del indicador pH en el medio escogido y la asimilación que es evidenciada por el crecimiento del organismo en el pocillo cuando el sustrato es usado como la única fuente disponible de carbono. (Manual API, bioMérieux, Inc, Francia).

COMPOSICION DE LA GALERIA API 50 CH™

La composición de la galería API 50 CH puede verse a continuación en la relación de ensayos según el Manual API, bioMérieux:

Cuadro 4. Componentes activos de la galería API 50 CH.

a) Fila de 0 a 9

TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO	CANTIDAD (mg/cúpula)
0		TESTIGO	-
1	GLY	GLIcerol	1,64
2	ERY	ERItrol	1,44
3	DARA	D-ARAbinosa	1,4
4	LARA	L-ARAbinosa	1,4
5	RIB	D-RIBosa	1,4
6	DXYL	D-XILosa	1,4
7	LXYL	L-XILosa	1,4
8	ADO	D-ADOnitol	1,36
9	MDX	Metil-βD-Xilopiranosida	1,28

b) Fila de 10 a 19

TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO	CANTIDAD (mg/cúpula)
10	GAL	D-GALactosa	1,4
11	GLU	D-GLUcosa	1,56
12	FRU	D-FRUctosa	1,4
13	MNE	D-MamNosA	1,4
14	SBE	L-SorBosA	1,4
15	RHA	L-RHAMnosa	1,36
16	DUL	DULcitol	1,36
17	INO	INOsitol	1,4
18	MAN	D-MANitol	1,36
19	SOR	D-SORbitol	1,36

c) Fila de 20 a 29

TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO	CANTIDAD (mg/cúpula)
20	MDM	Metil- α D-Manopiranosida	1,28
21	MDG	Metil- α D-Glucopiranosida	1,28
22	NAG	N-AcetilGlucosamina	1,28
23	AMY	AMlgdalina	1,08
24	ARB	ARButina	1,08
25	ESC	ESCulina citrato férrico	0,152
26	SAL	SALicina	1,04
27	CEL	D-CELobiosa	1,32
28	MAL	D-MALTosa	1,4
29	LAC	D-LACTosa	1,4

d) Fila de 30 a 39

TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO	CANTIDAD (mg/cúpula)
30	MEL	D-MELibiosa	1,32
31	SAC	D-SACarosa	1,32
32	TRE	D-TREhalosa	1,32
33	INU	INUlina	1,28
34	MLZ	D-MeLeZitosa	1,32
35	RAF	D-RAFinosa	1,56
36	AMD	AlmiDón	1,28
37	GLYG	GLIcóGeno	1,28
38	XLT	XiLiToI	1,4
39	GEN	GENTIobiosa	0,5

e) Fila de 40 a 49

TUBO	ENSAYO	COMPONENTE ACTIVO	CANTIDAD (mg/cúpula)
40	TUR	D-TURanosa	1,32
41	LYX	D-LIXosa	1,4
42	TAG	D-TAGatosa	1,4
43	DFUC	D-FUCosa	1,28
44	LFUC	L-FUCosa	1,28
45	DARL	D-ARabitoL	1,4
46	LARL	L-ARabitoL	1,4
47	GNT	GlucoNaTo potásico	1,84
48	2KG	2-CetoGluconato potásico	2,12
49	5KG	5-CetoGluconato potásico	1,8

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras para la presente investigación se obtuvieron en las queserías artesanales de la Comunidad Campesina de Haparquilla a 25 km de la ciudad del Cusco. Se encuentra ubicada entre los 3379 msnm, con una extensión de 540 Ha (GORE, Cusco 2012) ubicada entre las coordenadas UTM 18L 806607E y 8509521S en el distrito y provincia de Anta. (Ver gráfico N° 1)

2.2 MATERIALES

2.2.1 Muestra

- Queso fresco de elaboración artesanal.

2.2.2 Cepas de ensayo

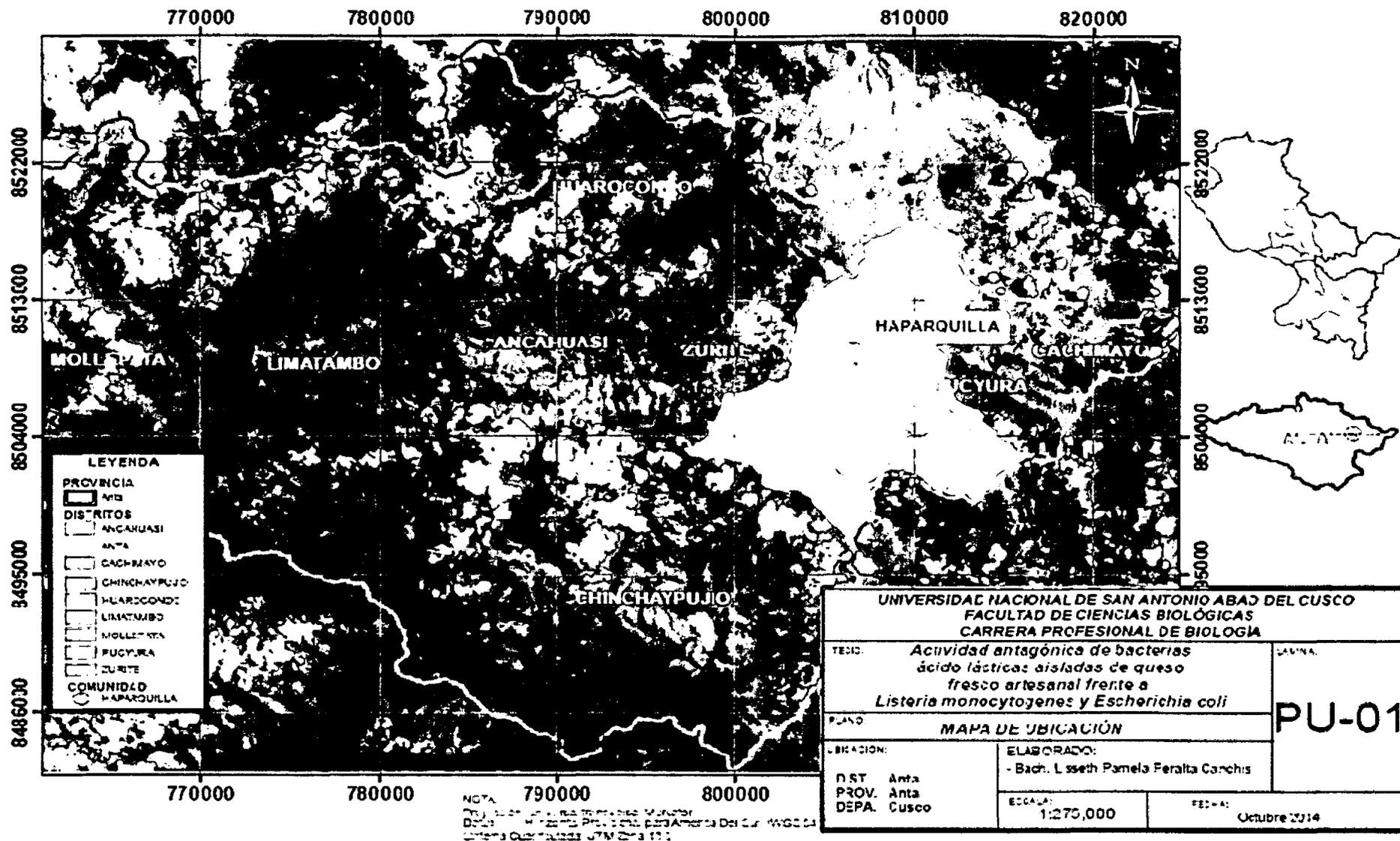
- *Listeria monocytogenes* ATCC 19118
- *Escherichia coli* ATCC 8739

2.2.3 Materiales de laboratorio

Equipos

- Incubadora
- Horno Pasteur
- Autoclave
- Microscopio óptico
- Balanza de precisión
- Refrigeradora
- Congeladora -20° C
- pH-metro
- Centrifuga
- Motor de licuadora

Gráfico 1. Mapa de ubicación de la Comunidad Campesina de Haparquilla-Anta



Fuente: Elaboración propia

Material de vidrio

- Placas Petri
- Matraces Erlenmeyer
- Probetas
- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos
- Tubos de ensayo
- Pipetas 1 ml 1/100
- Pipetas de 5 ml 1/100
- Pipetas de 10 ml 1/100
- Vasos de licuadora

Medios de cultivo

- Agar MRS (Man-Rogosa-Sharpe)
- Caldo MRS (Man-Rogosa-Sharpe)
- Agar Mueller-Hinton
- Agar de Soya Trypticaseína
- Caldo de Soya Trypticaseína
- Caldo de Soya Trypticaseína modificado al 0.85% para la inoculación de microorganismos patógenos y/o deterioradores para la detección de la inhibición microbiana de las BAL.
- API 50 CHL™ medium (bioMérieux)

Reactivos

- Solución Ringer
 - Cloruro de sodio.....2,25 g/L
 - Cloruro de Potasio.....0,105 g/L
 - Cloruro de Calcio 6H₂O.....0,120 g/L
 - Bicarbonato de Sodio.....0,05 g/L
- Reactivos para tinción Gram
 - Solución cristal violeta.
 - Solución safranina.

Solución de yodo.

Solución alcohol cetona.

- Peróxido de hidrogeno al 30% (Prueba de catalasa)
- Reactivo para oxidasa (clorhidrato de tetrametil-p-fenilindiamina al 1%)
- Hidroxido de Sodio 2,5 N
- Galerias API 50 CH
- Glicerol.
- Aceite mineral

Otros materiales

- Filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0,20 micras (Ministart-Sartorius)
- Escala de McFarland 0.5, 1 y 2
- Cilindros de acero inoxidable de 8mm de diámetro x 10mm de altura
- Jarras de anaerobiosis
- Tubos de microcentrifuga
- Asas de siembra de 0,1 ml
- Aguja de siembra
- Mechero Bunsen
- Propipeta
- Micropipeta
- Tijeras
- Bolsas de polipropileno
- Papel craft
- Parafilm
- Gradillas
- Pinzas
- Bisturí
- Guantes estériles
- Mascarillas

2.3 METODOLOGIA

2.3.1 MUESTREO Y TOMA DE MUESTRA

Se efectuó un muestreo no probabilístico en las queserías artesanales de la Comunidad Campesina de Haparquilla del distrito y provincia de Anta, región Cusco. Durante los meses de septiembre y noviembre del 2013.

Para el muestreo y toma de muestras se utilizó la metodología descrita por Clavel M., 2006:

Se tomó al azar una muestra de queso fresco de cada productor de la mencionada comunidad haciendo un total de 14, señalando que 9 muestras tenían un día de elaboración y cinco tenían dos días de elaboración, diferencia que se tomó en consideración para el tratamiento estadístico.

Estas muestras fueron tomadas en bolsas de polipropileno estériles debidamente codificadas y transportadas en un cooler refrigerado a 4° C al laboratorio de Biotecnología y Fisiología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas para su procesamiento

2.3.2 AISLAMIENTO Y RECuento DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Para el recuento y aislamiento de bacterias ácido lácticas se recurrió a la metodología descrita por Clavel M., 2006:

- Se pesaron 10 gramos de muestra en una placa Petri estéril.
- Se suspendieron en 90 ml de solución Ringer, y se licuó durante 30 segundos.
- Se realizaron diluciones mediante la transferencia de 1ml de la suspensión a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de solución Ringer, considerando esta como dilución 10^{-2} . De esta dilución se tomó 1 ml y se realizó el mismo procedimiento hasta llegar a la dilución 10^{-6} .
- La siembra y el aislamiento se realizó por agotamiento en superficie en agar MRS.
- Se incubó a $31 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas en condiciones de anaerofilia.
- Los recuentos de las colonias características de BAL se expresaron en UFC/ml.

2.3.3 SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

- Para obtener cultivos puros se utilizó la técnica utilizada por Neria A., 2006 para lo cual se procedió a realizar una nueva siembra de cada colonia con morfología típica de las BAL (color blanco, consistencia cremosa, generalmente pequeñas), en caldo MRS. Se incubó a $31 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas.
- A partir de cada cultivo se realizó siembra por estrías en agar MRS y se incubó a $31 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 h en condiciones de anaerofilia.
- Para confirmar que eran BAL, se realizó la tinción Gram, la prueba de oxidasa y la prueba de catalasa.

Tinción de Gram:

- En un portaobjetos se preparó un frotis de la muestra a observar y se fijó a llama directa.
- Se cubrió el frotis con cristal violeta y se dejó reaccionar por 1 min. Se quitó el exceso de colorante y se lavó con agua corriente.
- En seguida se aplicó la solución de yodo, se dejó reaccionar por 1 min y se lavó con agua corriente. Con cuidado se agregó una solución de alcohol acetona (70/30), gota a gota con el portaobjetos inclinado hasta ya no observar color, se lavó con agua corriente.
- Se cubrió el frotis con la solución de safranina y se dejó reaccionar por 30 segundos, se lavó el exceso de colorante y se dejó secar al aire.
- Se observó al microscopio y se seleccionaron las bacterias Gram positivas. (INCB, 2002).

Prueba de catalasa:

- Se recogió con un asa de inoculación el centro de una colonia obtenida de un cultivo puro. Se colocó sobre un portaobjetos, se agregó una gota de H_2O_2 al 30% sobre el cultivo y se verificó la generación de burbujas. Se considera como prueba negativa la ausencia de burbujas. (INCB, 2002).

Prueba de la oxidasa:

- Se adicionó sobre una colonia del microorganismo unas gotas del reactivo para oxidasa (clorhidrato de tetrametil-p-fenilindiamina al 1%) y se observó si la colonia cambió de color a azul, la presencia de éste color señaló la positividad de la prueba (INCB, 2002).

2.3.4 CONGELACIÓN DE CEPAS PURAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

El procedimiento para la congelación de cepas fue descrito por Lapage S. y col., 1970 y modificada por Clavel M., 2006.

- A partir del cultivo en placa con agar MRS, se transfirió 1 colonia pura a un tubo con 10 ml de caldo MRS y se incubó a $31 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 12 horas.
- Se tomaron 100 μl del cultivo, se inocularon en otro tubo con 10 mL de caldo MRS, se incubó por 24 horas posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min para poder separar las células bacterianas que serán congeladas.
- Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 8 mL de caldo MRS con 20% de una solución de glicerol (utilizado como un agente crioprotector penetrador por su capacidad de introducirse en el interior de la célula a través de la membrana celular) y se homogenizó.
- Finalmente se distribuyó el cultivo en 8 tubos de micro centrifuga estériles (Eppendorf) y se llevaron al congelador a -20°C .

2.3.5 DETERMINACIÓN “IN VITRO” DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Para el presente trabajo de investigación, se utilizó la prueba discriminativa de punto final pues se evaluó por un tiempo determinando si existía actividad antagónica o no.

La inhibición del crecimiento de las cepas se demostró por el método de “difusión en agar” (Tagg & McGiven, 1971) adaptada por Concha P., 2010.

- Los cultivos libres de células se obtuvieron inoculando 100 μl de las BAL, previamente revivificadas, en tubos de centrifuga con 10 ml de caldo MRS.

- Tras un periodo de incubación de 12 horas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ se obtuvo un sobrenadante mediante centrifugación (4000 rpm por 15 min), el que posteriormente se filtró utilizando filtros de jeringa de acetato de celulosa de $0.20 \mu\text{m}$ de diámetro de poro.
- Sobre una placa Petri que contenía una capa delgada de agar Mueller Hinton con la superficie bien seca, se depositaron de forma equidistante cilindros de acero inoxidable esterilizados.
- Se utilizó un inóculo de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC de cada patógeno según la escala 0,5 de Mc Farland; para ello se inoculó ambos patógenos en caldo tripticasa de soya y se incubaron a 37°C por 24 horas
- Se vertió 10 ml de Agar TSA semisólido (0,85% de agar) inoculado con 1 ml del cultivo de cada patógeno a ensayar.
- Una vez solidificada la sobrecapa se retiraron los cilindros y en los pocillos formados se depositó 100 μl de sobrenadante de los cultivos libres de células de las BAL.
- Después de incubar las placas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas y bajo condiciones aeróbicas, la actividad antagónica de los cultivos libres de células, se determinó midiendo la zona o halo de inhibición del crecimiento de la bacteria patógena alrededor del pocillo.
- La actividad contra *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* fue expresada en milímetros, un halo de inhibición ≥ 3 mm de radio medido desde el borde del pocillo, fue considerado como resultado positivo.

2.3.6 IDENTIFICACION DE LAS CEPAS CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA.-

En base a la actividad antagónica evidenciada para las 75 cepas aisladas y tomando en cuenta como criterios de selección los siguientes:

- Halo de inhibición \geq a 3 mm de radio.
- Efecto antagónico frente a *Listeria monocytogenes* o *Escherichia coli* o ambos patógenos.

Se seleccionaron 10 cepas para su identificación.

Para la identificación bioquímica de las cepas de BAL, se utilizó el sistema API 50 CHL, el cual permite la identificación de cepas del género *Lactobacillus* y géneros relacionados de BAL.

El llenado de los microtubos con el medio 50 CHL, adición del inóculo, incubación, lectura e interpretación de las pruebas se realizó de acuerdo con la metodología descrita previamente en una ficha técnica incluida en el sistema API 50 CH™ (bioMérieux, Inc.) y que se describe a continuación.

a) Selección de las colonias: Se utilizaron cepas congeladas, por lo que se realizaron 2 subcultivos en caldo MRS.

Se cultivó la cepa sobre agar MRS durante 24 h a $30 \pm 1^\circ \text{C}$ y se verificó su pertenencia a las BAL.

b) Preparación de la galería: Se consultó la ficha técnica API 50 CH™. Cada placa tiene 5 tiras con 10 microtubos numerados; las tiras fueron ordenadas en secuencia y colocadas en la caja plástica de incubación. Para crear una atmósfera con suficiente humedad se distribuyeron 10 mL de agua destilada estéril en la placa de incubación.

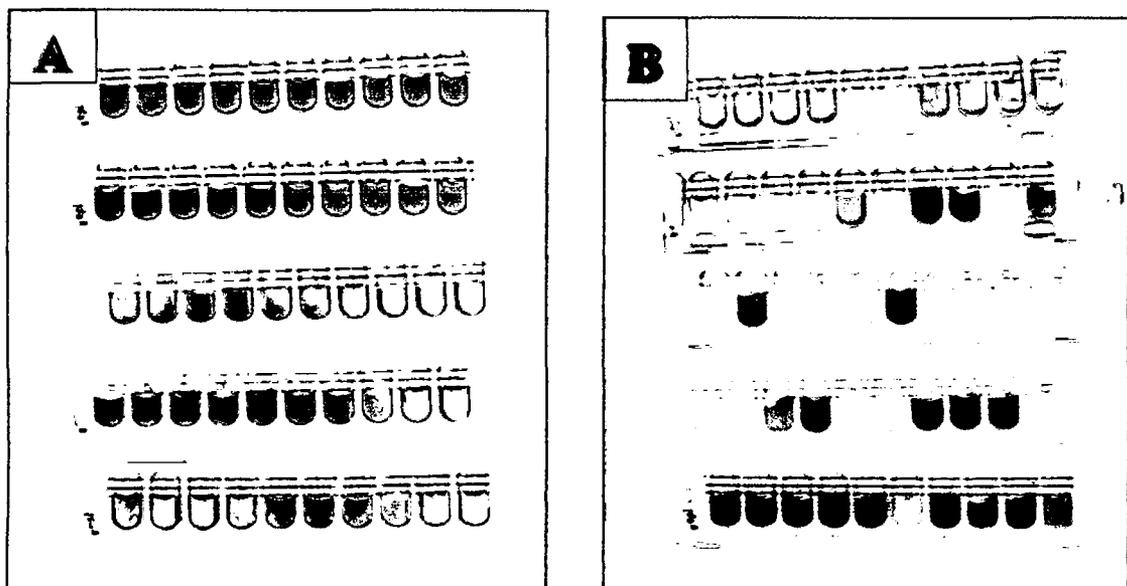
c) Preparación del inóculo: Para obtener una suspensión bacteriana densa, se transfirieron varias colonias de la placa Petri al tubo con medio de suspensión (2 ml de agua destilada estéril). Posteriormente en otro tubo que contenía 5 ml de medio de suspensión (agua destilada estéril) se realizó una suspensión de turbidez igual al patrón 2 de la escala de McFarland transfiriendo un cierto número de gotas de la primera suspensión (se anotó el número exacto de gotas), finalmente se inoculó el doble del número de gotas citadas en el tubo que contenía 10 ml del medio API 50 CHL™.

d) Inoculación de la galería: Se inclinó ligeramente hacia adelante la caja de incubación y con la ayuda de una pipeta estéril, evitando la formación de burbujas, se repartió la suspensión bacteriana en cada uno de los 50 microtubos de la galería. El inóculo se recubrió con aceite mineral para crear condiciones anaeróbicas. Las cajas se incubaron a $30 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 48 h.

e) Lectura e interpretación de las galerías: Las galerías se leyeron a las 24 y 48 h de incubación. En cada microtubo se observó la acidificación del medio, producto de la fermentación del sustrato. Una prueba positiva es visible por el viraje del indicador púrpura de bromocresol a un color amarillo.

Para el análisis de esculina (microtubo 25), la prueba positiva se observa cuando el medio pasa de un color púrpura a negro por la reacción de sales de hierro y esculina derivado de la hidrólisis de la esculina. Los resultados fueron anotados en la hoja de resultados como: positivo (+), negativo (-) y dudoso (?); posteriormente se pasaron al programa API LAB Plus (BioMérieux, Inc.) para establecer la identidad de la bacteria.

Gráfico 2. Sistema de identificación API 50 CHL.



Fuente: API BiomeriuX. A, patrón negativo; B, reacción de carbohidratos. Pocillos que mantienen el color violáceo del patrón, indican reacción negativa (no fermenta el azúcar). Pocillos donde el indicador vira a amarillo, indican reacción positiva (fermentación del azúcar).

2.3.7 INFLUENCIA DEL pH, TEMPERATURA, TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE EL EFECTO ANTAGÓNICO DE LOS CULTIVOS LIBRES DE CÉLULAS

A.- INFLUENCIA DEL pH

Se midió el pH de los cultivos libres de células de las 10 cepas identificadas obteniéndose un valor promedio de 4,0 el mismo que se consideró como pH inicial, posteriormente, se distribuyeron alícuotas de 3,0 ml de los cultivos libres de células en tubos estériles y se ajustó a pH 6,5 y pH 8,0 con NaOH 2.5 N con el fin de descartar el efecto antagónico se deba a la acción de los ácidos

orgánicos producidos por las BAL y además para comprobar la estabilidad de las posibles sustancias inhibidoras a pHs neutros.

Luego del tratamiento, se ensayó la actividad antagónica mediante la técnica de difusión en agar (Tagg & McGiven, 1971)

B.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Se distribuyeron 3 alicuotas de 1,0 ml de los cultivos libres de células de cada una de las 10 cepas de BAL identificadas y se almacenaron a -20 °C, 4 °C y 25°C por 30 días, determinando la actividad antagónica de los cultivos libres de células a los 8, 15 y 30 días por el método de difusión en agar (Tagg & McGiven, 1971)

Se eligió una temperatura de congelación, una de refrigeración y una que se encuentra en el rango de temperatura óptima de crecimiento de las BAL.

2.3.8 VERIFICACIÓN DE LA TERMORESISTENCIA DE LOS CULTIVOS LIBRES DE CÉLULAS

Para comprobar la termoresistencia de los cultivos libres de células de las diez cepas de BAL identificadas, se tomó 1 ml de cada uno en tubos Eppendorf, los cuales se sometieron a 121°C durante 15 minutos en autoclave, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se realizó la prueba de inhibición por el método de difusión en agar (Tagg & McGiven, 1971)

2.3.9 ANÁLISIS DE DATOS

El análisis estadístico fue realizado mediante estadística descriptiva y análisis de varianza (ANOVA).

La separación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey – B, a un nivel de significancia preestablecido del 5%. Para el análisis de los datos se utilizó el software estadístico IBM SPSS versión 21 (2012)

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 AISLAMIENTO Y RECuento DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

A continuación se muestran los cuadros con los recuentos de bacterias ácido lácticas expresadas en log 10 ufc/g obtenidos a partir de las muestras de queso fresco y calculados en base a los datos consignados en el cuadro del anexo 1. Las muestras han sido agrupadas de acuerdo al número de días de elaboración para poder analizar estadísticamente las diferencias que pueden existir en la población de BAL presentes en dicho producto.

Cuadro 5. Recuento de BAL (log ufc/g) en queso fresco a un día de elaboración.

UN DÍA DE ELABORACIÓN	
CODIGO DE MUESTRA	PROMEDIO LOG.10 UFC/g
QF 01	7.77
QF 02	7.75
QF 03	7.65
QF 05	7.78
QF 06	7.80
QF 08	8.54
QF 09	8.60
QF 10	8.36
QF 14	7.81

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 6. Recuento de BAL (log ufc/g) en queso fresco a dos días de elaboración.

DOS DIAS DE ELABORACIÓN	
CODIGO DE MUESTRA	PROMEDIO LOG.10 UFC/g
QF 04	8.60
QF 07	7.76
QF 11	8.39
QF 12	8.50
QF 13	8.46

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 7. Estadísticos descriptivos del recuento de BAL

ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS	UN DIA DE ELABORACIÓN LOG.10 UFC/ML	DOS DIAS DE ELABORACIÓN LOG.10 UFC/g
Media	8,0067	8,3420
Intervalo de confianza para la media al 95%		
Límite inferior	7,7161	7,9272
Límite superior	8,2972	8,7568
Media recortada al 5%	7,9935	8,3600
Mediana	7,8000	8,4600
Varianza	0,143	0,112
Desv. típ.	0,37802	0,33410
Mínimo	7,65	7,76
Máximo	8,60	8,60

Fuente: Elaboración propia.

De los cuadros 5 y 6 de recuentos de BAL respecto al número de días de elaboración del queso, se desprende el cuadro 7 que muestra los estadísticos descriptivos de dichos recuentos. Este cuadro muestra que el recuento promedio y la mediana son mayores (8,3420 log.10 ufc/ml y 8,4600 respectivamente) a los dos días de producción, lo que demuestra que hay mayor presencia de estas bacterias a mayor número de días de elaboración.

Este resultado concuerda con la investigación realizada por Cogan y col (1997) y Estepar y col. (1999) que indican que en quesos artesanales, los microorganismos lácticos en los primeros días de elaboración son mucho mayores, y se puede explicar por el elevado número de estas bacterias en la leche y además indican que en las fábricas artesanales la maduración tanto de un día como de hasta cinco días presenta mayor crecimiento de bacterias lácticas.

Los resultados del recuento de las BAL al ser superiores a 8 log.10 ufc/ml, son atribuidos a las condiciones de elaboración y conservación del queso lo que permite el incremento de la flora láctica naturalmente presente, atribuyéndose este hecho, a que las bacterias lácticas tienen la capacidad de crecer entre los 5°C y 30°C considerándose que al haber sido elaborados de manera artesanal, son almacenados a temperatura ambiente siendo este factor importante en el

crecimiento bacteriano; además, otro factor que influye, es el alto contenido de humedad del queso fresco.

En general el crecimiento de diferentes grupos microbianos durante la producción y almacenamiento de quesos frescos producidos de manera artesanal puede deberse al empleo de leche cruda y a la no utilización de cultivos iniciadores (Orozco, 1999).

De acuerdo a la metodología, a partir de las 14 muestras de queso fresco provenientes de las queserías artesanales de la comunidad campesina de Haparquilla-Anta, se aislaron 75 cepas de bacterias ácido lácticas utilizando el medio de cultivo agar Man Rogosa Sharpe (MRS).

Estas cepas fueron identificadas macroscópicamente, por presentar un color blanco, consistencia cremosa y ser generalmente pequeñas (Figura 1). Bajo microscopia, se observaron bacilos Gram positivos (Figura 1) las pruebas bioquímicas fueron catalasa y oxidasa negativas (Figura 2). Todas las cepas obtenidas, fueron debidamente codificadas y luego congeladas a -20 °C para ser sometidas posteriormente a las pruebas de inhibición.

Figura 1 Características macroscópicas y microscópicas (1000 X) de BAL.

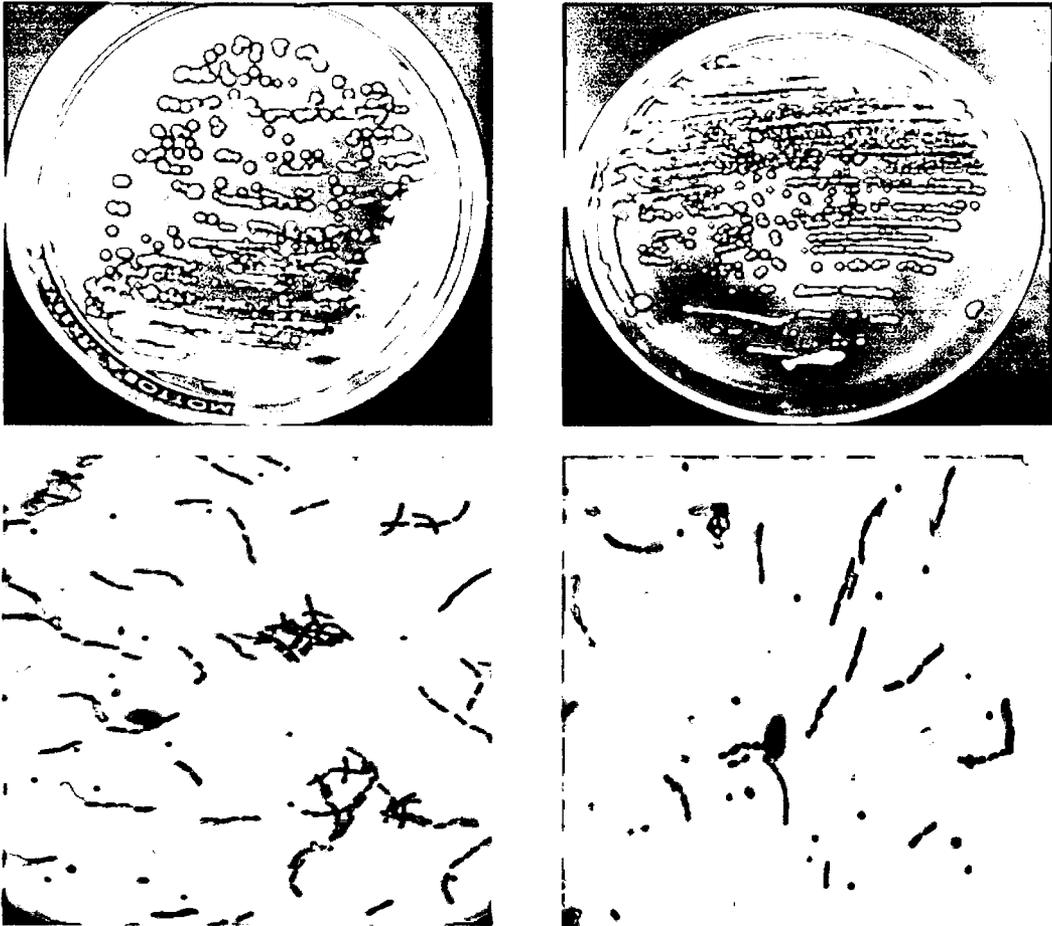
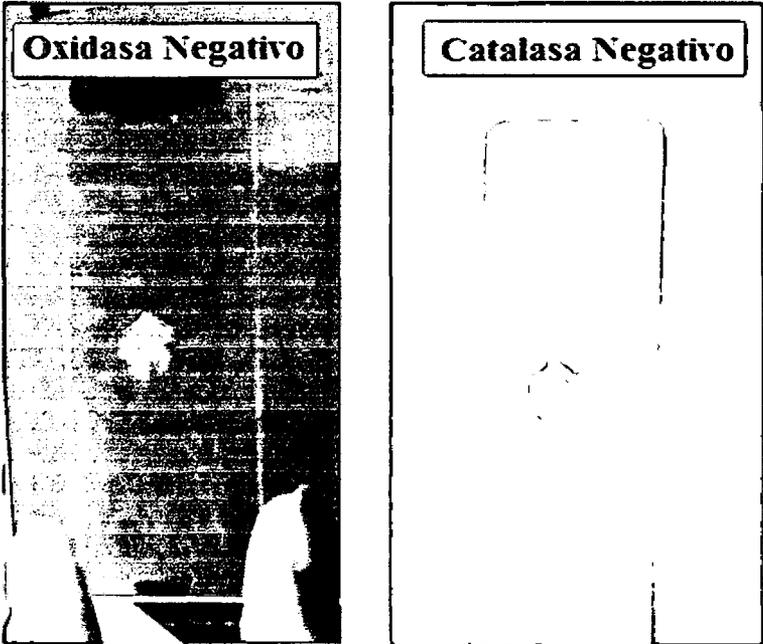


Figura 2 Pruebas bioquímicas de oxidasa y catalasa.



3.2 ACCIÓN ANTAGÓNICA DE LOS CULTIVOS LIBRES DE CÉLULAS DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS

La actividad antagónica de cultivos libres de células de 75 cepas de BAL aisladas se determinó a través del método de difusión en agar utilizando los cultivos libres de células frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 y *Escherichia coli* ATCC 8739 como cepas patógenas indicadoras.

Luego de un tamizaje, las cepas aisladas con un halo de inhibición mayor a 3 mm y que además tuvieron actividad frente a ambos indicadores o al menos frente a uno de ellos.

3.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS

Los patrones de fermentación por lo general son característicos para grupos bacterianos específicos o especies; por lo que bajo ésta premisa se determinó la identidad de las cepas, probando la capacidad de las bacterias para degradar un hidrato de carbono específico incorporado en los microtubos de las tiras del sistema API 50 CH (BioMérieux).

No todos los sustratos fueron degradados por todas las bacterias; con las diferencias entre estos patrones de degradación, se identificaron las bacterias ácido lácticas.

De las 75 cepas se seleccionaron 10 cepas en base a la actividad antagónica evidenciada por presentar halos de inhibición $\geq 3\text{mm}$ y haber presentado actividad por lo menos frente a uno de los patógenos de prueba o a ambos.

De estas cepas, cinco fueron identificadas como *Lactobacillus plantarum*, dos como *Lactobacillus brevis*, dos como *Lactobacillus pentosus* y una como *Lactococcus lactis ssp. lactis*.

En los siguientes cuadros, se muestran los perfiles de fermentación simplificados, obtenidos con el sistema API 50 CH™ (bioMérieux).

Cuadro 8. Perfiles de fermentación de *Lactobacillus plantarum*

CARBOHIDRATO	<i>Lactobacillus plantarum</i> FM 41	<i>Lactobacillus plantarum</i> FM 44	<i>Lactobacillus plantarum</i> FM 45	<i>Lactobacillus plantarum</i> FM 46	<i>Lactobacillus plantarum</i> FN 47
L- ARABINOSA	+	+	+	+	-
D-RIBOSA	+	+	+	+	+
D-XILOSA	+	-	+	+	+
L-XILOSA	-	-	-	-	+
D-GALACTOSA	+	+	+	+	-
D-GLUCOSA	+	+	+	+	+
D-FRUCTOSA	+	+	+	+	+
D-MANOSA	+	+	+	+	-
L-SORBOSA	-	-	-	-	+
L-RHAMNOSA	+	+	-	-	-
DULCITOL	-	-	-	-	+
INOSITOL	-	-	-	-	-
D-MANITOL	+	+	+	+	-
D-SORBITOL	+	-	+	+	+
METIL-D-MANOPIRANOSIDA	+	+	+	+	+
METIL GLUCOPIRANOSIDA	+	-	-	-	+
N-ACETILGLUCOSAMINA	+	+	+	+	-
AMIGDALINA	+	+	+	+	+
ARBUTINA	+	+	+	+	+
ESCULINA	+	+	+	+	+
SALICINA	+	+	+	+	+
D-CELOBIOSA	+	+	+	+	+
D-MALTOSA	+	+	+	+	+
D-LACTOSA	+	+	+	+	+
D-MELOBIOSA	+	+	+	+	+
D-SACAROSA	+	+	+	+	+
D-TREHALOSA	+	+	+	+	-
INULINA	-	-	-	-	-
D-MELEZITOSA	+	+	+	+	+
D-RAFINOSA	+	+	+	+	+
ALMIDON	-	-	-	-	-
GLICOGENO	-	-	-	-	-
XILITOL	-	-	-	-	-
GENTIOBIOSA	+	+	+	+	+
D-TURANOSA	+	-	+	+	-
D-LIXOSA	-	-	-	-	-
D-TAGATOSA	+	-	-	-	-
D-FUCOSA	-	-	-	-	-
L-FUCOSA	-	-	-	-	-
D-ARABITOL	+	+	-	-	+
L-ARABITOL	-	-	-	-	-
GLUCONATO DE POTASICO	-	-	-	-	-
2-CETOGLUCONATOPOTASICO	-	-	-	-	-
5-CETOGLUCONATOPOTASICO	-	-	-	-	+

Del cuadro 8 de acuerdo al perfil obtenido, se identificaron 5 cepas como *Lactobacillus plantarum* que producen ácido por la fermentación de arabinosa, ribosa, manitol, sorbitol, amigdalina, esculina, celobiosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa, melecitosa y rafinosa; además no degradan inositol, arabitol, ramnosa ni xilitol.

Según el perfil obtenido se clasificó a *Lactobacillus plantarum* dentro del grupo de las bacterias heterofermentativas facultativas; ya que si se observa ésta especie utiliza pentosas (arabinosa, ribosa, xilosa) ingresando estos compuestos gracias a permeasas específicas y a continuación son convertidos en D-xilulosa-5-fosfato y finalmente en lactato y acetato. En la industria alimentaria el empleo de este microorganismo presenta diferentes beneficios en los procesos de fermentación; en la industria láctea se emplea como cultivo iniciador, produciendo sabores, textura, además de incrementar la calidad nutricional de los alimentos (González-Martínez *et al.*, 2003).

Cuadro 9. Perfiles de fermentación de *Lactobacillus brevis*

CARBOHIDRATO	<i>Lactobacillus brevis</i> FM 14	<i>Lactobacillus brevis</i> FM 30
D-RIBOSA	+	+
D-XILOSA	+	+
L-XILOSA	+	-
D-ADONITOL	-	-
METIL-D-XILOPIRANOSIDA	+	-
D-GALACTOSA	-	+
D-GLUCOSA	+	+
D-FRUCTOSA	+	+
D-MANOSA	+	+
L-SORBOSA	+	-
D-MANITOL	+	+
D-SORBITOL	+	+
METIL-D-MANOPIRANOSIDA	-	+
METIL GLUCOPIRANOSIDA	+	-
N-ACETILGLUCOSAMINA	+	+
AMIGDALINA	+	+
ARBUTINA	+	+
ESCULINA	+	+
SALICINA	+	+
D-CELOBIOSA	+	+
D-MALTOSA	+	+
D-LACTOSA	+	-
D-MELOBIOSA	+	+

D-SACAROSA	+	+
D-TREHALOSA	+	+
INULINA	+	+
D-MELEZITOSA	+	+
D-RAFINOSA	+	+
GENTIOBIOSA	+	+
D-TURANOSA	+	-
D-LIXOSA	-	-
D-TAGATOSA	+	-
D-FUCOSA	-	-
L-FUCOSA	-	-
D-ARABITOL	-	-
L-ARABITOL	-	-
GLUCONATO DE POTASICO	-	-
2-CETOGLUCONATOPOTASICO	-	+
5-CETOGLUCONATOPOTASICO	-	+

En el cuadro 9 según los perfiles de fermentación obtenidos para las especies de *Lactobacillus brevis* degradaron los siguientes carbohidratos y polialcoholes arabinosa, ribosa, xilosa, galactosa, esculina, maltosa, melibiosa, rafinosa, sacarosa y manitol; además de no producir ácido a partir de melecitosa, arabitol, 2-cetogluconato potásico y 5-cetogluconato potásico.

Con estos resultados se infiere, que estas especies de *Lactobacillus* es heterofermentativas pues utilizará la vía del 6-fosfogluconato para producir ácido láctico.

Cuadro 10. Perfiles de fermentación de *Lactobacillus pentosus*

CARBOHIDRATO	<i>Lactobacillus pentosus</i> FM 38	<i>Lactobacillus pentosus</i> FM 39
GLICEROL	-	-
ERITROL	-	-
D-ARABINOSA	-	-
L-ARABINOSA	-	+
D-RIBOSA	+	+
D-XILOSA	+	+
L-XILOSA	+	-
D-ADONITOL	-	+
METIL-D-XILOPIRANOSIDA	-	-
D-GALACTOSA	-	+
D-GLUCOSA	+	+
D-FRUCTOSA	+	+
D-MANOSA	+	+
L-SORBOSA	-	+
L-RHAMNOSA	-	-
DULCITOL	-	-
INOSITOL	-	-
D-MANITOL	+	+
D-SORBITOL	+	+
METIL-D-MANOPIRANOSIDA	+	-
METIL GLUCOPIRANOSIDA	+	+
N-ACETILGLUCOSAMINA	+	+
AMIGDALINA	+	+
ARBUTINA	+	+
ESCULINA	+	+
SALICINA	+	+
D-CELOBIOSA	+	+
D-MALTOSA	+	+
D-LACTOSA	+	+
D-MELOBIOSA	+	+
D-SACAROSA	+	+
D-TREHALOSA	+	+
INULINA	-	+
D-MELEZITOSA	+	+
D-RAFINOSA	+	+
ALMIDON	-	-
GLICOGENO	-	-
XILITOL	-	-
GENTIOBIOSA	-	-
D-TURANOSA	-	+
D-LIXOSA	-	-
D-TAGATOSA	-	+
D-FUCOSA	-	-
D-ARABITOL	-	-
L-ARABITOL	-	+
GLUCONATO DE POTASICO	-	-
2-CETOGLUCONATOPOTASICO	-	-
5-CETOGLUCONATOPOTASICO	+	-

En el cuadro 10 se observa que las cepas de *Lactobacillus pentosus* degradan arabinosa, ribosa, xilosa, ramnosa, manitol, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa y rafinosa; en cambio son incapaces de fermentar sorbosa, inositol, lixosa, fucosa, 2-cetogluconato potásico y 5-cetogluconato potásico

Cuadro 11. Perfil de fermentación de *Lactococcus lactis ssp lactis*

CARBOHIDRATO	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> FM 37
L- ARABINOSA	+
D-RIBOSA	+
D-XILOSA	+
D-GALACTOSA	+
D-GLUCOSA	+
D-FRUCTOSA	+
D-MANOSA	+
L-SORBOSA	-
L-RHAMNOSA	-
DULCITOL	-
INOSITOL	-
D-MANITOL	+
D-SORBITOL	+
METIL-D-MANOPIRANOSIDA	+
METIL GLUCOPIRANOSIDA	+
N-ACETILGLUCOSAMINA	-
AMIGDALINA	+
ARBUTINA	+
ESCULINA	+
SALICINA	+
D-CELOBIOSA	+
D-MALTOSA	+
D-LACTOSA	+
D-MELOBIOSA	-
D-SACAROSA	-
D-TREHALOSA	-
INULINA	-
D-MELEZITOSA	-
D-RAFINOSA	-
ALMIDON	-
GLICOGENO	-
XILITOL	-
GENTIOBIOSA	-
D-TURANOSA	-
L-ARABITOL	-
GLUCONATO DE POTASICO	-
2-CETOGLUCONATOPOTASICO	-
5-CETOGLUCONATOPOTASICO	+

La especie *Lactococcus lactis ssp lactis* (10%) tiene como funciones principales en la fermentación de leche, la producción de ácido láctico a partir de lactosa, la hidrólisis de caseína y la fermentación de ácido cítrico. Además, algunas enzimas producidas y los productos finales de fermentación tienen influencia significativa de forma directa o indirecta en la formación de textura, sabor y calidad higiénica de los alimentos (Jay, 2000).

El 100% de las cepas analizadas presentaron la capacidad para fermentar la lactosa (principal azúcar presente en productos lácteos); la mayoría de las especies de BAL degradan este sustrato introduciéndolo a la célula mediante permeasas específicas e hidrolizándolo con β -galactosidasas para obtener glucosa y galactosa, para ser empleadas como fuente de carbono vía glucólisis (Bucio, 2004).

Los géneros identificados fueron dos, *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Comparando estos resultados con lo descrito por Mossel y col., (2003) quien menciona que los géneros tradicionales de las BAL son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*, en la presente investigación se lograron aislar dos de estos géneros representativos.

Una posible razón puede ser porque fueron elaborados artesanalmente, es decir, su fermentación es espontánea y no por la adición de cultivos iniciadores (Medina, 1990); otra razón puede deberse a que los otros géneros *Streptococcus* y *Leuconostoc* mencionados por Mossel y col. (2003) no son flora microbiana propia de los quesos y la leche.

La especie *Lactobacillus plantarum* fue la que más presencia tuvo (50%) debido a que esta especie se encuentra en la leche de manera natural lo cual favorece que estas BAL estén activas durante todo el proceso de elaboración del producto; también se debe a que este tipo de quesos, no tienen un periodo de maduración notorio y contiene un alto contenido de humedad lo que favorece notablemente su crecimiento. (Alais, 1985).

En la industria láctea se emplea como cultivo iniciador, produciendo sabores, textura, además de incrementar la calidad nutricional de los alimentos (González-Martínez *et al.*, 2003); sin embargo cabe resaltar, que los productos de los cuales fueron aislados estas bacterias no presentan cultivos iniciadores por lo que su presencia se debería netamente a que forman parte de la flora microbiana normal de la leche con la que son

elaborados dichos productos.

Las otras especies de lactobacilos aisladas como es el caso de *Lactobacillus brevis* (20%) y *Lactobacillus pentosus* (20%) son las responsables de la iniciación de la fermentación láctica además de proporcionar el sabor ácido a los quesos; no obstante su presencia responde a que forman parte de la microbiota de la leche (Fernández, 2000).

3.4 INFLUENCIA DEL pH SOBRE EL EFECTO ANTAGÓNICO DE LOS CULTIVOS LIBRES DE CÉLULAS DE BAL

A continuación se muestran los resultados obtenidos y las diferencias que estos mostraron en su actividad antagonica.

Gráfico 3. *Lactobacillus plantarum* frente a *Listeria monocytogenes*

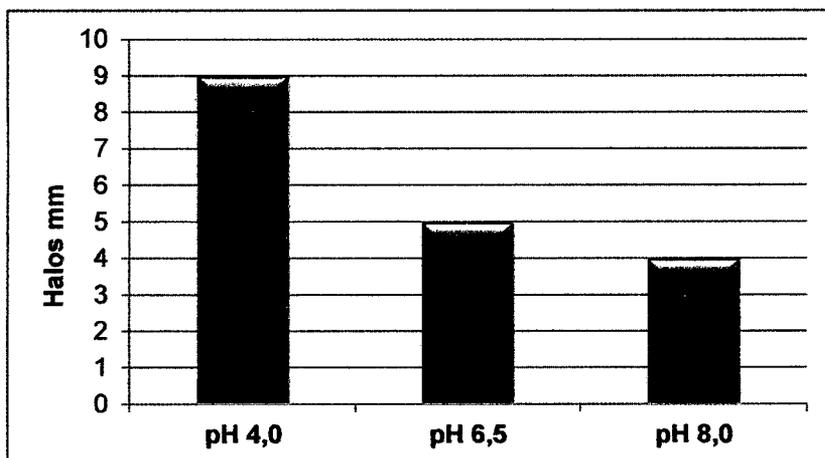


Gráfico 4. *Lactobacillus brevis* frente a *Listeria monocytogenes*

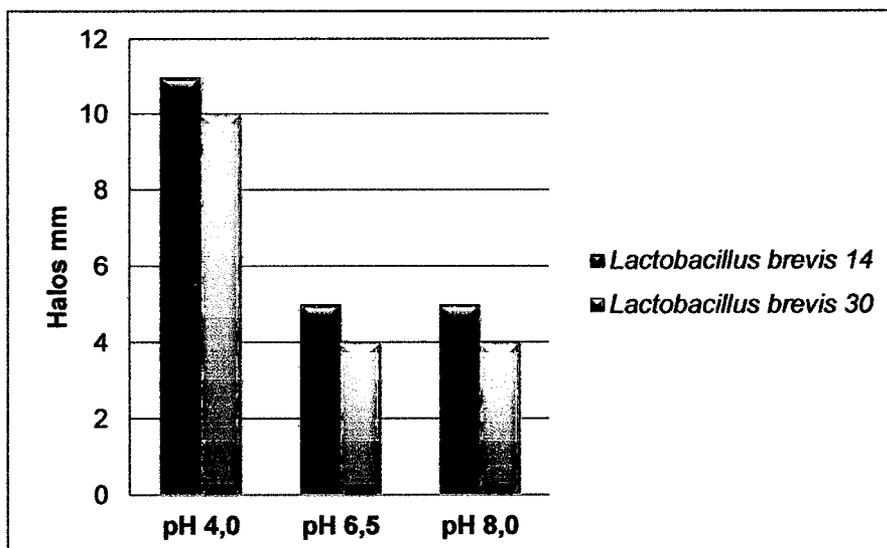
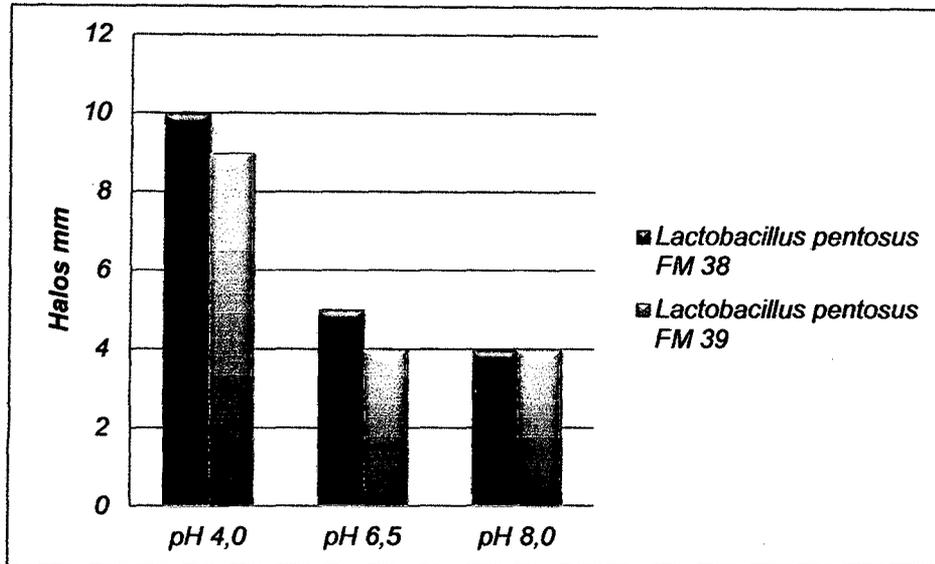


Gráfico 5. *Lactobacillus pentosus* frente a *Listeria monocytogenes*



En los gráficos 3,4 y 5 se observa que la mejor actividad inhibitoria frente a *Listeria monocytogenes* fue producida por los cultivos libres de células de las cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus pentosus*, a pH 4,0.

En el caso de *Lactobacillus plantarum* el efecto antagónico a pH 6,5 se redujo en 44,4% mientras que a pH 8,0 se redujo en 55,5% respecto al pH inicial (4,0).

Para el caso de los cultivos libres de células de las dos cepas de *Lactobacillus brevis* se observan comportamientos diferentes entre ellas. Una de ellas a pH inicial presentó un halo de 11 mm mientras que la otra de 10 mm. Pero el comportamiento de ambas cepas es el mismo ya que ambas a pH 6,5 pierden 54,5% y a pH 8,0 pierden 63,6% de actividad antagónica.

Lo mismo ocurre con las dos cepas de *Lactobacillus pentosus*, con el pH inicial (4,0) la actividad antagónica difiere en 1 mm, mientras que a pH 6,5 *Lactobacillus pentosus* FM 38 pierde 50% de su actividad, mientras que *Lactobacillus pentosus* FM 39 pierde 60%.

Cabe mencionar, que el cultivo libre de células de *Lactococcus lactis ssp lactis* no presentó actividad antagónica frente a *Listeria monocytogenes*.

Aplicando el ANOVA a los resultados se obtienen los datos que se muestran en el cuadro siguiente:

Cuadro 12. ANOVA para la influencia del pH en la actividad antagónica de cultivos libres de células de BAL frente a *Listeria monocytogenes*

Fuentes de variación	Suma de cuadrados tipo III	Grados de Libertad	Media cuadrática	F	Sig.
pH	130,867	2	65,433	14,649	0,000
Error	130,867	27	4,467		
Total	120,600	30			

De acuerdo a la tabla de ANOVA, se observa que existen diferencias significativas en el tratamiento al que fueron sometidos los cultivos libres de células de las BAL. Esta afirmación se deduce por el valor de significancia alcanzada por los tratamientos (0.000), que viene a ser menor al nivel de significancia de 0.05 (95%). Por lo que se afirma que el pH si influye en la actividad antagónica de los cultivos libres de células de las BAL.

Cuadro 13. Prueba de Tukey B para la influencia del pH en la actividad antagónica de cultivos libres de células de BAL frente a *Listeria monocytogenes*

<i>Listeria monocytogenes</i>				
	pH	N	Subconjunto	
			1	2
Tukey B ^{a,b}	pH 8	10	3,7000	
	pH 6,5	10	4,3000	
	pH	10		8,4000
	Inicial			

La prueba de Tukey B para determinar los sub conjuntos que se formaron con el tratamiento de pH, muestra dos subconjuntos, el primer subconjunto a pH 6,5 y 8,0 cuyo efecto sobre la actividad antagónica es mayor con respecto al segundo subconjunto a pH 4,0 que tiene un efecto mayor frente a *Listeria monocytogenes* y es estadísticamente mejor.

En el gráfico 6, se observa la pronunciada actividad antagónica de los cultivos libres de células de *Lactococcus lactis ssp lactis* frente a *Escherichia coli* al pH inicial 4,0 mientras que al ser elevado, su actividad se verá afectada en un 20% a 6,5 y 21,4% a pH 8,0

Gráfico 6. *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli*

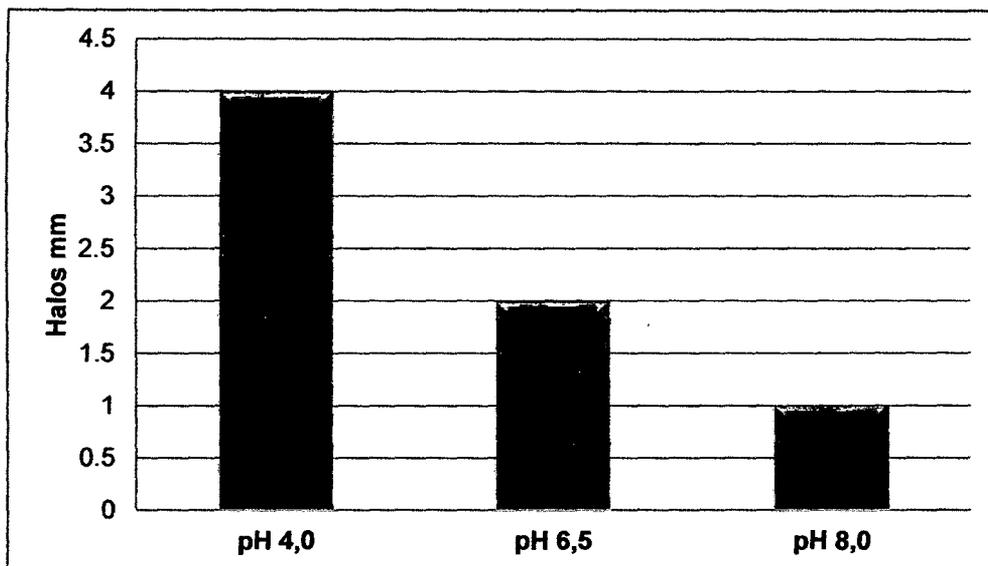
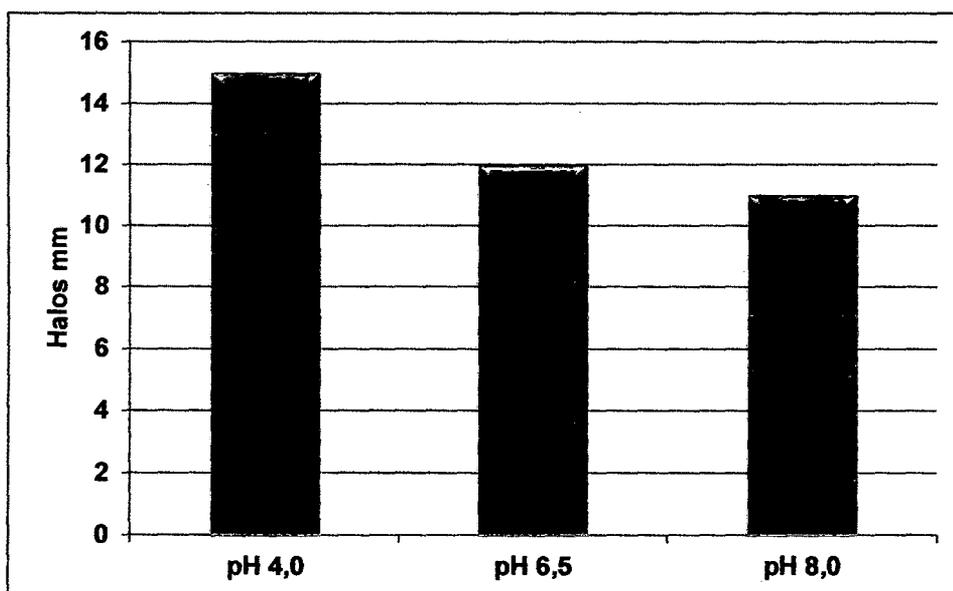


Gráfico 7. *Lactococcus lactis ssp lactis* frente a *Escherichia coli*



En el caso de *Lactobacillus plantarum* en el gráfico 7, se observa un halo de inhibición de 4 mm a pH 4, 0, mientras que a pH 6,5 la actividad disminuye en un 50% y 75% a pH 8,0.

Los cultivos libres de células de *Lactobacillus brevis* y *pentosus*, no presentaron actividad frente a *Escherichia coli*.

De acuerdo a la tabla de ANOVA, se observa que no existen diferencias significativas en el tratamiento al que fueron sometidos los cultivos libres de células de las BAL. Esta afirmación se deduce por el valor de significancia alcanzada por los tratamientos (0,519), que viene a ser mayor al nivel de significancia de 0.05 (95%). Por lo que se afirma que el pH no influye en la actividad antagonica de los cultivos libres de células de las BAL.

Cuadro 14. ANOVA para la influencia del pH en la actividad antagonica de cultivos libres de células de BAL frente a *Escherichia coli*

Fuentes de variación	Suma de cuadrados tipo III	Grados de Libertad	Media cuadrática	F	Sig.
pH	18,867	2	9,433	0,673	0,519
Error	378,500	27	14,019		
Total	575,000	30			

Cuadro 15. Prueba de Tukey B para la influencia del pH en la actividad antagonica de cultivos libres de células de BAL frente a *Escherichia coli*

	pH	N	Subconjunto
			1
Tukey B ^{a,b}	pH 8	10	1,6000
	pH 6,5	10	2,2000
	pH	10	3,5000
	Inicial		

La Prueba de Tukey B, muestra un solo subconjunto para los tratamientos de cambios de pH, es decir, no muestran estadísticamente diferencias significativas, determinando así que la actividad antagónica no fue afectada por el pH.

Estos resultados, indican que los ácidos orgánicos ejercieron un importante efecto sobre la actividad antagónica del cultivo libre de células de las BAL identificadas, sin embargo, el antagonismo no se debió solamente a la acidificación del medio a consecuencia de la producción de ácidos orgánicos, sino que también puede ser atribuida a la producción de otras sustancias o compuestos, tales como peróxido de hidrógeno y/o bacteriocinas.

En el estudio realizado por Ligocka y Paluszak (2004) reportaron que las cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* presentan buena capacidad inhibitoria frente a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis, resultados que coinciden con los obtenidos en la presente investigación tomando en cuenta que los ensayos de antagonismo fueron realizados en condiciones aerobias.

Estrada y col. (2005) quienes evaluaron la actividad inhibitoria por el método de difusión en pozos a diferentes pHs, determinaron que a pH 5,5 se presenta la mejor actividad de los extractos de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum* e inhibieron el crecimiento de bacterias como *Salmonella spp* y *Escherichia coli*, en la presente investigación, si bien el descenso de pH no afectó la actividad antagónica de los cultivos libres de células de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* frente a *Escherichia coli* se observó que a pH 6,5 la actividad se afecta drásticamente frente a un pH 4,0.

En la presente investigación, los cultivos libres de células de la cepa de *Lactococcus lactis ssp. lactis*, presentó actividad solo contra *Escherichia coli*, a pesar de que *Lactococcus lactis ssp. lactis* es una cepa productora de bacteriocinas como lacticin 481, nisina Z, nisina A, entre otras que reporta Arqués et al. (2004). La resistencia de las bacterias Gram positivas (*Listeria monocytogenes*) a las bacteriocinas producidas por los cultivos libres de células de *Lactococcus lactis subsp lactis* aislada, puede ser atribuida a una resistencia natural debido a la carencia de receptores específicos para las

bacteriocinas, o a la producción de enzimas que la destruyen (Ennahar et al., 2000; Martín, 2002).

Murry *et al.* (2004) caracterizaron los compuestos producidos por *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus salivarius* responsables de la inhibición de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Estas especies de *Lactobacillus* producen niveles de pH bajos por la fermentación de los carbohidratos, por lo que la inhibición se asocia a la producción de ácido láctico y ácido acético que inhiben el crecimiento de estas bacterias Gram negativas, resultados que coinciden con los obtenidos puesto que los mejores halos de inhibición se dieron a pH 4,0.

En un estudio realizado por Hernández *et al.* (2004) se reportó la capacidad de las cepas de BAL aisladas de queso para producir compuestos antimicrobianos. Identificaron a *Lactobacillus plantarum* TF711 la cual presentó actividad antimicrobiana en un amplio rango de pH que va de 1 a 9, la actividad antimicrobiana se presentó contra bacterias como *Bacillus cereus*, *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei* y *Klebsiella pneumoniae* y *Listeria monocytogenes*. En el presente trabajo, la actividad de *Lactobacillus plantarum*, si bien se vio reducida no se vio anulada en los rangos de pH probados.

3.5 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE EL EFECTO ANTAGÓNICO DE LOS CULTIVOS LIBRES DE CÉLULAS DE BAL.

En los gráficos que se presentan a continuación, se muestran los resultados de la actividad de los cultivos libres de células de BAL a diferentes tiempos de almacenamiento y temperaturas, precisando que al octavo día de almacenamiento no registro ninguna variación en la actividad antagónica de las cepas en estudio por lo que no se consideró el valor inicial (día cero).

Gráfico 8. *Lactobacillus plantarum* frente a *Listeria monocytogenes* a -20°C

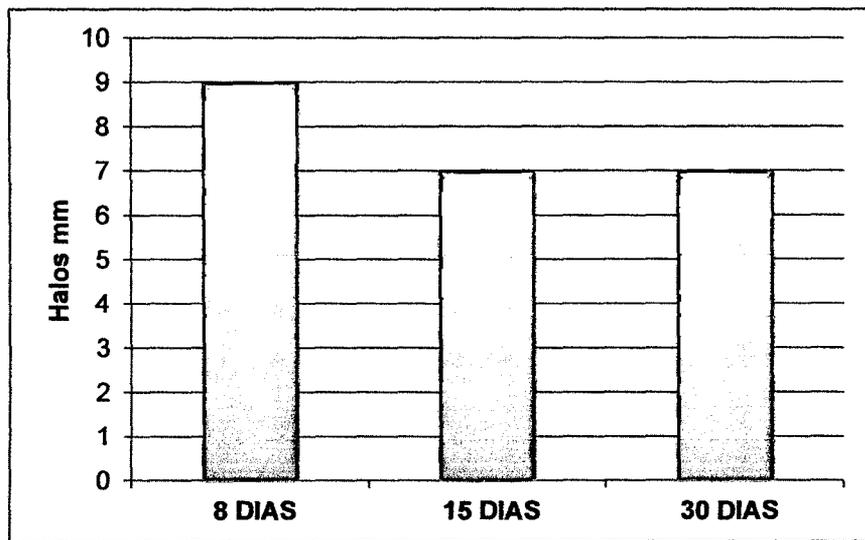


Gráfico 9. *Lactobacillus brevis* frente a *Listeria monocytogenes* a -20°C.

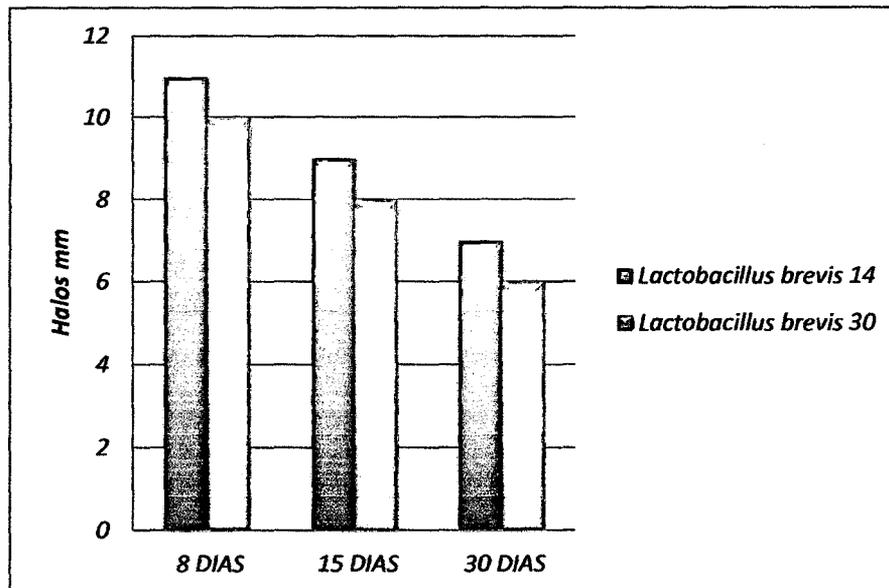


Gráfico 10. *Lactobacillus pentosus* frente a *Listeria monocytogenes* a -20°C.

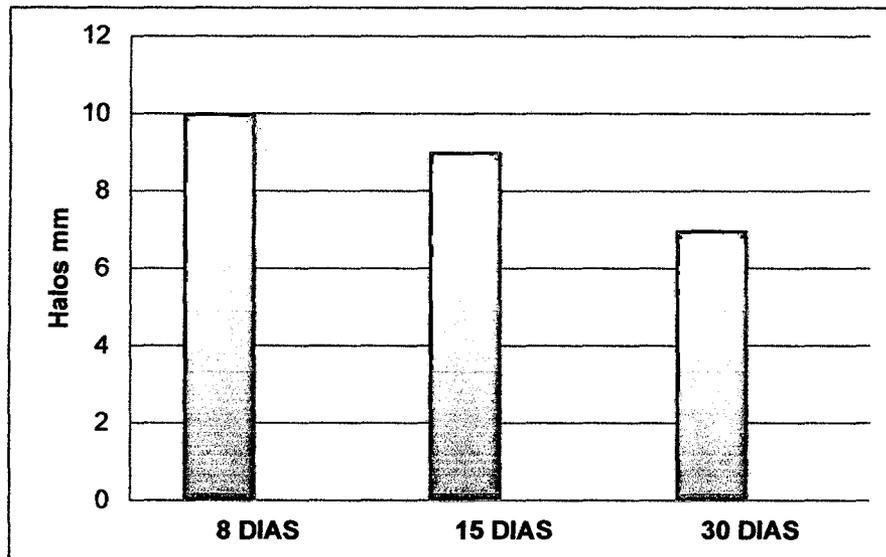


Gráfico 11. *Lactobacillus plantarum* frente a *Listeria monocytogenes* a 4°C.

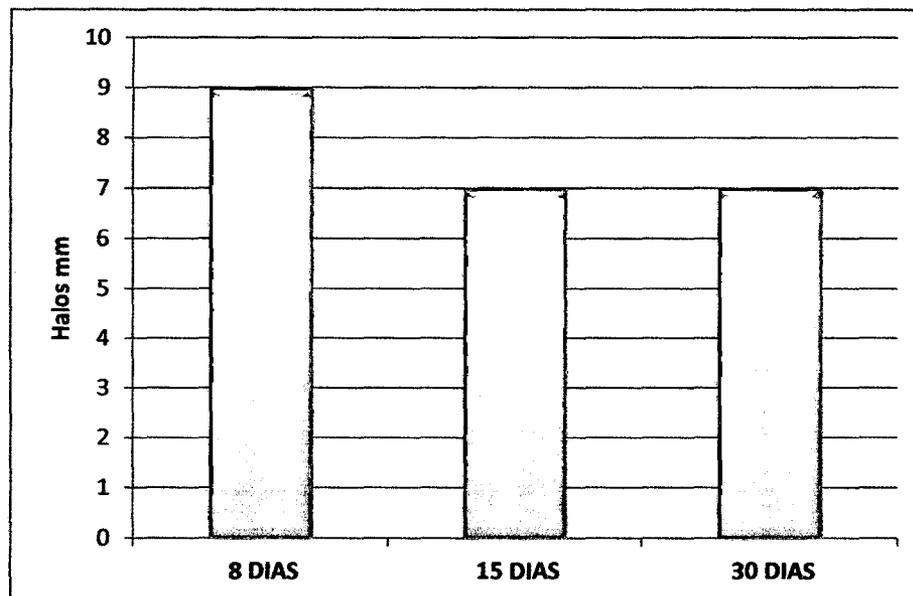


Gráfico 12. *Lactobacillus brevis* frente a *Listeria monocytogenes* a 4°C.

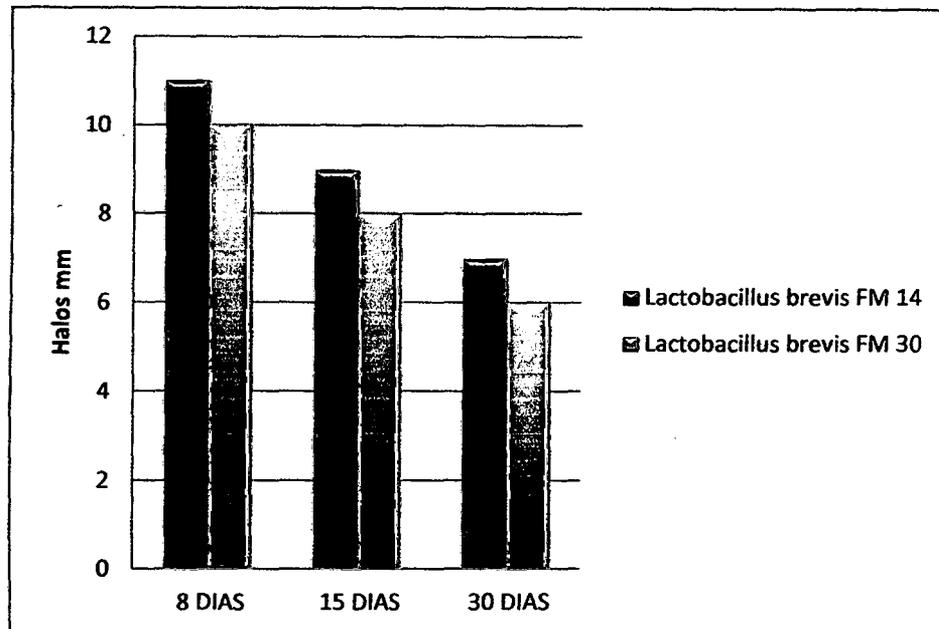
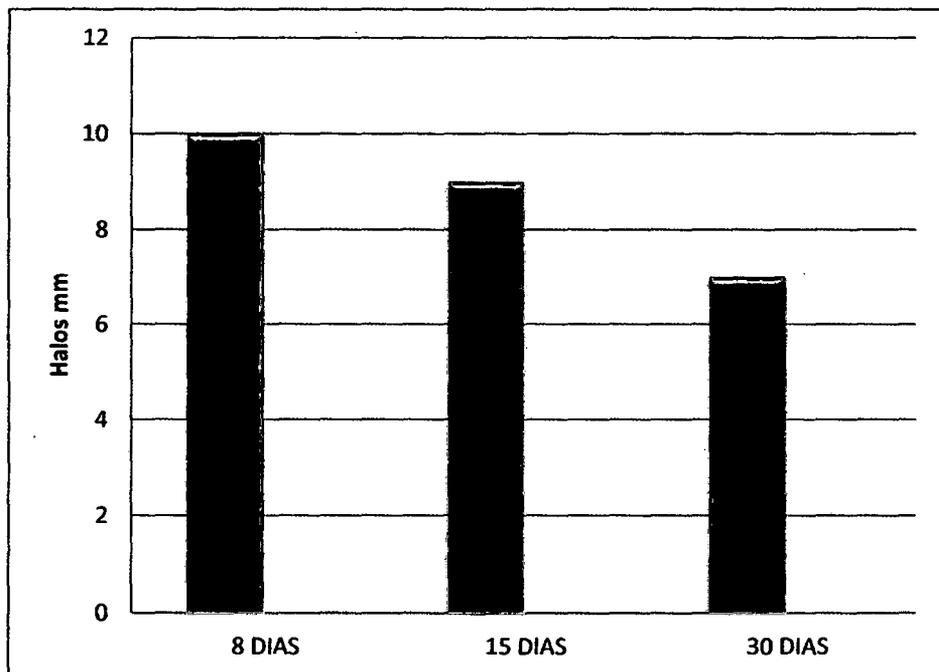


Gráfico 13. *Lactobacillus pentosus* frente a *Listeria monocytogenes* a 4° C.



Respecto a los gráficos 8, 9, 10, 11, 12 y 13, se puede observar que la actividad antagonica de los cultivos libres de células de BAL respecto a las temperaturas de congelación (-20°C) y de refrigeración (4°C) fue la misma a pesar del tiempo de conservación.

Los cultivos libres de células de la cepa de *Lactobacillus plantarum* frente a *Listeria monocytogenes*, presentaron un descenso de su actividad en 22,2% a los 15 días que se mantuvo hasta los 30 días de pruebas.

La cepa de *Lactobacillus brevis* FM 14, tuvo un descenso de su actividad antagonica a los 15 días en 18,8% mientras que a los 30 días fue aún mayor (36,3%). Para la cepa de *Lactobacillus brevis* FM 30 a los 15 días la actividad disminuyó en 10% y a los 30 días en 40%.

En el caso de *Lactobacillus pentosus* a los 15 días disminuyó en 10% y a los 30 días en 30%.

Para la comparación de resultados de todos los caso se tomó como referencia los primeros 8 días de conservación de los cultivos libres de células de BAL.

El comportamiento de los cultivos libres de células de a 25°C se muestra en los gráficos 14,15 y 16

Gráfico 14. *Lactobacillus plantarum* frente a *Listeria monocytogenes* a 25°C.

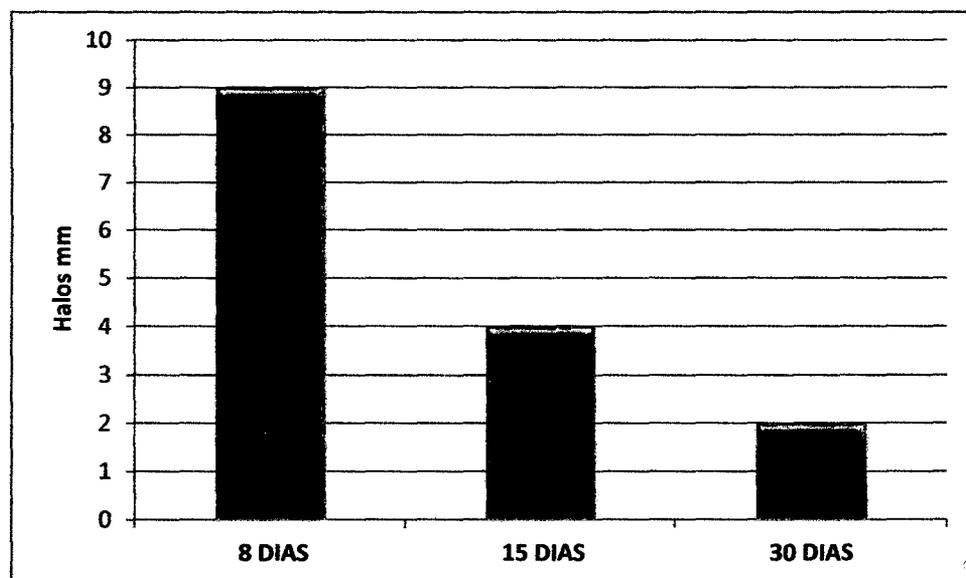


Gráfico 15. *Lactobacillus brevis* frente a *Listeria monocytogenes* a 25°C.

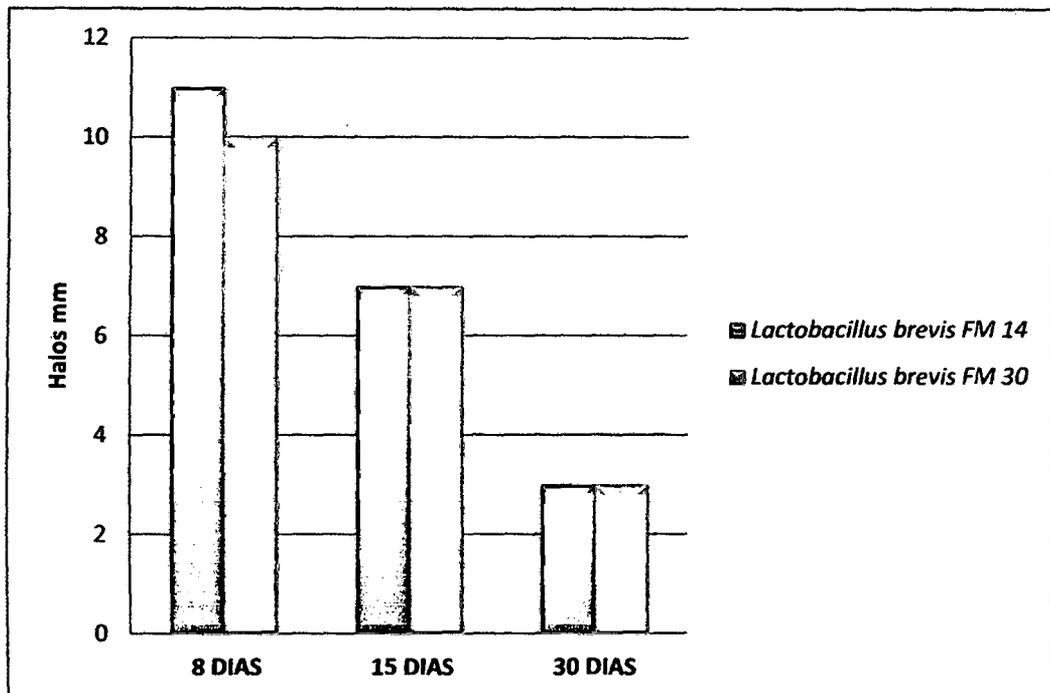
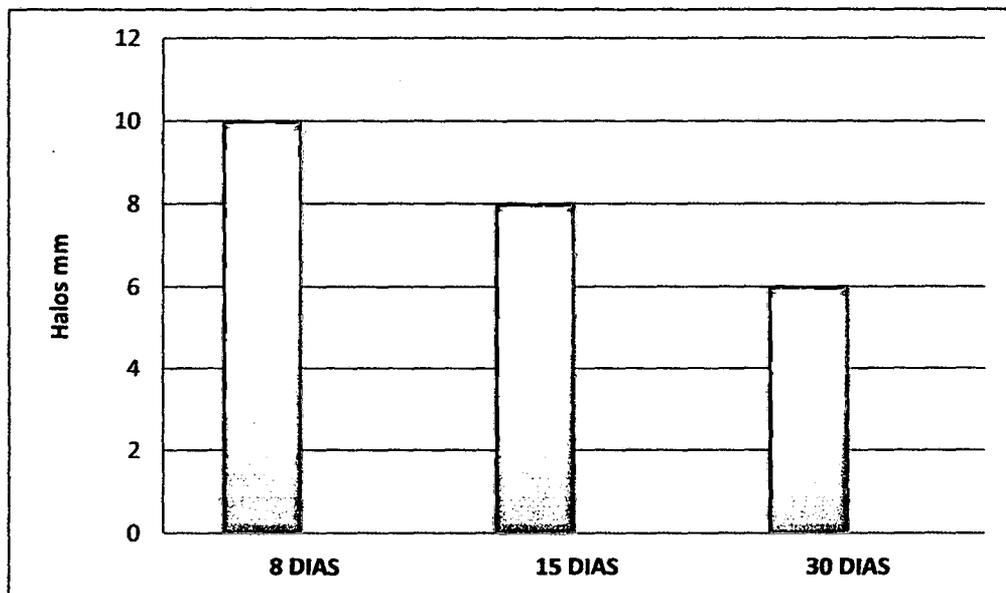


Gráfico 16. *Lactobacillus pentosus* frente a *Listeria monocytogenes* a 25° C.



Se observa un descenso aun mayor respecto a las temperaturas de congelación y refrigeración. En el caso de los cultivos libres de células de BAL de *Lactobacillus plantarum* la actividad antagónica disminuye 55,5% a los 15 días de almacenamiento, mientras que a los 30 días, el descenso es mucho mayor (77,7%).

El cultivo libre de células de *Lactobacillus brevis* FM 14 perdió en 36,6% de actividad a los 15 días de almacenamiento y 72,7% a los 30 días. Para el caso de *Lactobacillus brevis* FM 30, la actividad es 30% menor a los 15 días de almacenamiento y 70% menos a los 30 días.

Lactobacillus pentosus desciende su actividad en 20% a los 15 días de realizada las pruebas y 40% a los 30 días de almacenamiento.

A continuación se muestran los resultados del ANOVA y la prueba de Tukey B a la que fue sometido los datos obtenidos.

Cuadro 16. ANOVA para la influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento de los sobrenadantes libres de células BAL en la actividad antagónica frente a *Listeria monocytogenes*.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados tipo III	Grados de Libertad	Media cuadrática	F	Sig.
T° de almacenamiento	69,689	2	34,844	4,938	0,009
Tiempo de almacenamiento	179,822	2	89,911	12,741	0,000
T° y Tiempo	43,378	4	10,844	1,537	0,199
Error	571,600	81	7,057		
Total	4918,000	90			

De acuerdo a la tabla de ANOVA:

- Para la temperatura de almacenamiento se observa que existen diferencias significativas. Esta afirmación se deduce por el valor de significancia alcanzada por dicho tratamiento (0,009), que viene a ser menor al nivel de significancia de 0.05 (95%).
- Para el tiempo de almacenamiento se observa que existen diferencias significativas. Esta afirmación se deduce por el valor de significancia alcanzada por dicho tratamiento (0,000), que viene a ser menor al nivel de significancia de 0.05 (95%).
- Para el tiempo y temperatura de almacenamiento se observa que no existen diferencias significativas. Esta afirmación se deduce por el valor de

significancia alcanzada por dicho tratamiento (0,199), que viene a ser mayor al nivel de significancia de 0.05 (95%).

La prueba de Tukey B, muestra dos subconjuntos, el primer subconjunto a temperatura de -20°C y 4°C cuyo efecto actividad antagónica es mayor y el segundo subconjunto a 25°C que tiene un efecto menor frente a *Listeria monocytogenes*, siendo esta temperatura la que mostro halos de inhibición de menor tamaño.

Cuadro 17. Prueba de Tukey B para influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento de los sobrenadantes libres de células de BAL en la actividad antagónica frente a *Listeria monocytogenes*.

	Tratamiento	N	Subconjunto	
			1	2
Tukey B ^{a,b}	25	30	5,4667	
	-20	30		7,3333
	4	30		7,3333

En relación a la influencia de la temperatura de congelación (-20°) y la temperatura de refrigeración (4°C) en la actividad antagónica de los cultivos libres de células de BAL frente a *Escherichia coli*, los resultados obtenidos se muestran en los gráficos 17,18,19 y 20.

Grafico 17. *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli* a -20°C.

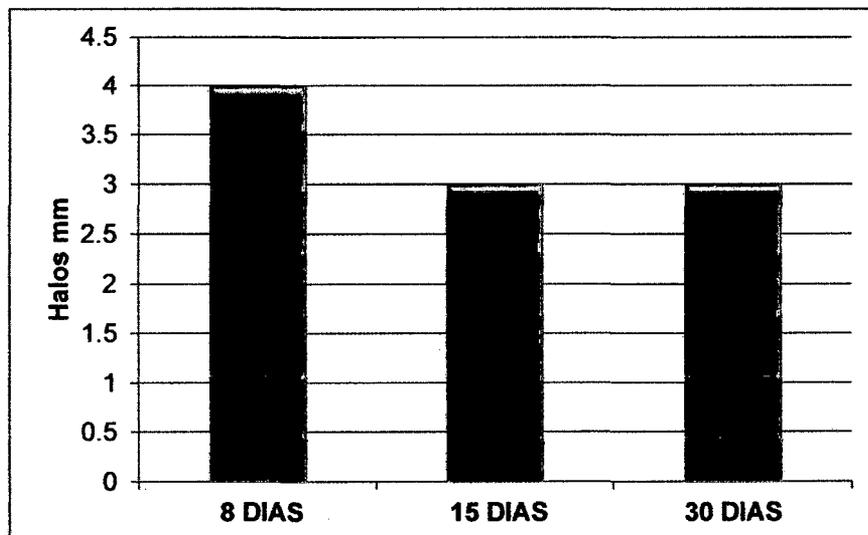


Grafico 18. *Lactococcus lactis* ssp *lactis* frente a *Escherichia coli* a -20°C

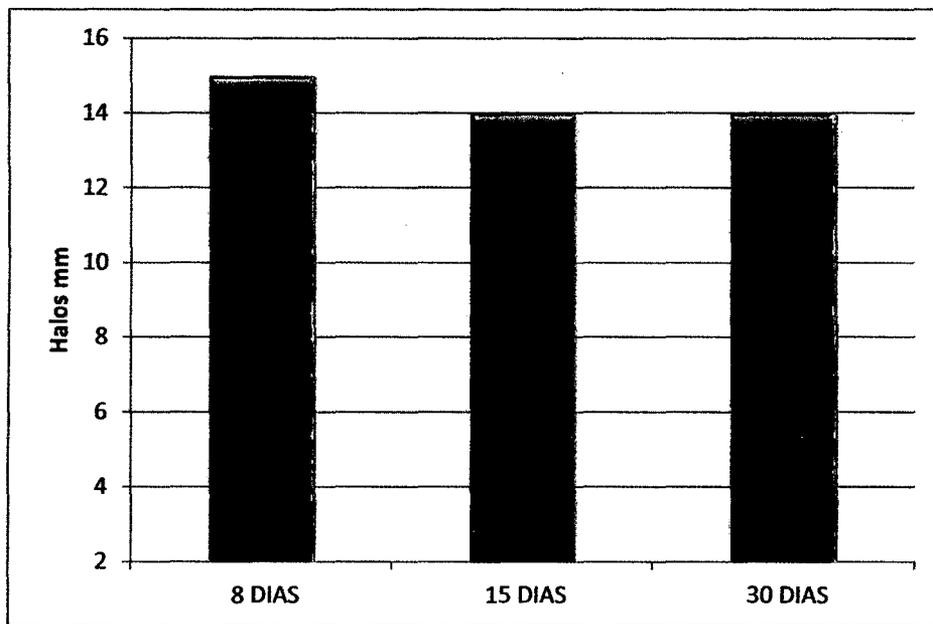


Grafico 19. *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli* a 4°C.

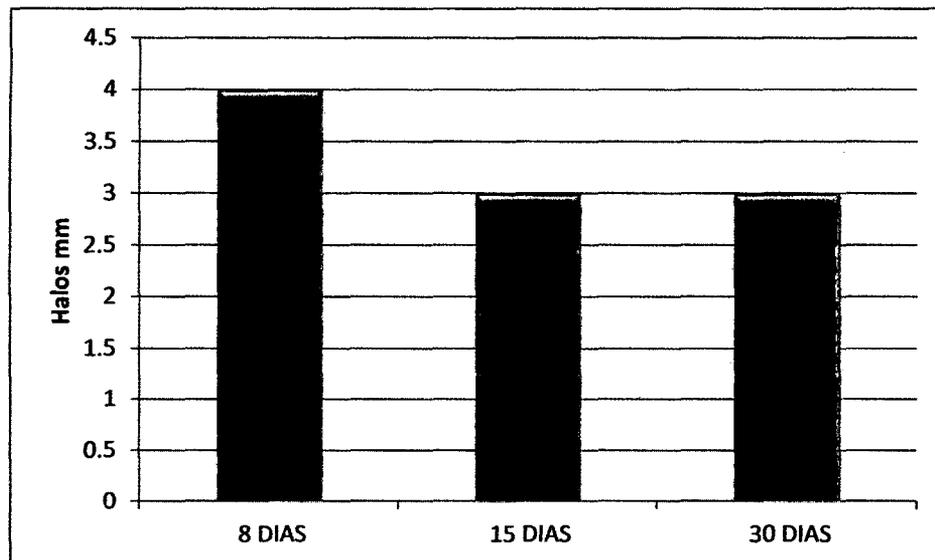
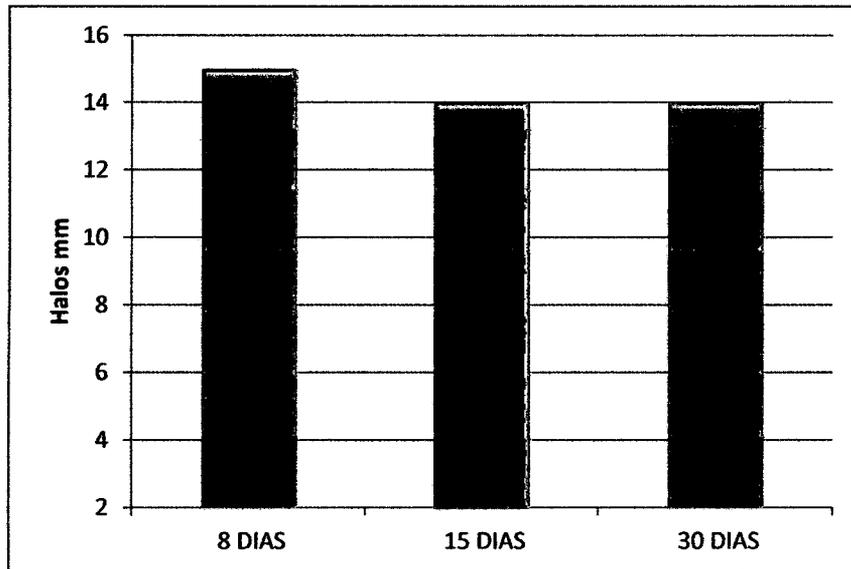


Grafico 20. *Lactococcus lactis ssp lactis* frente a *Escherichia coli* a 4°C.

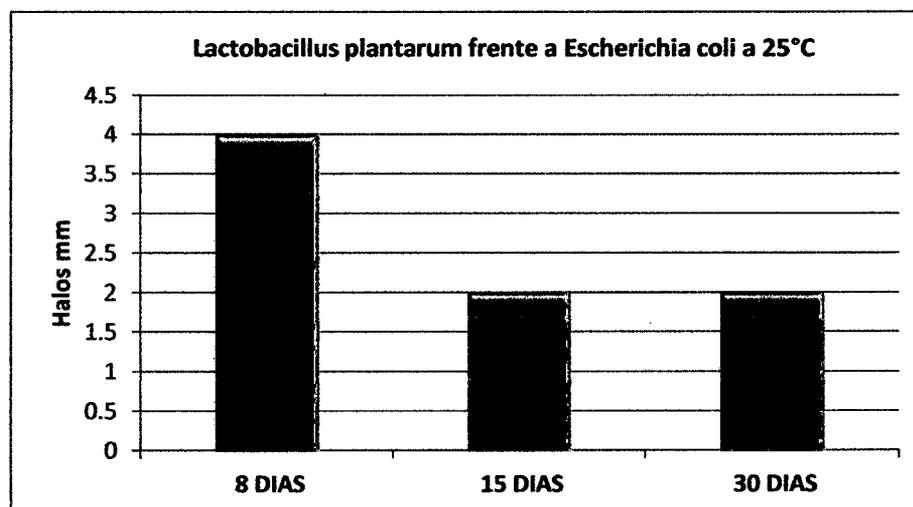


Los cultivos libres de células de *Lactobacillus plantarum*, presentaron un descenso de su actividad antagónica de 25% tanto en la temperatura de congelación como en la de refrigeración a los 15 y 30 días de almacenamiento.

Para el caso de *Lactococcus lactis ssp lactis*, hay un descenso de 6,67% de su actividad tanto a -20°C como a 4°C a los 15 y 30 días de almacenamiento.

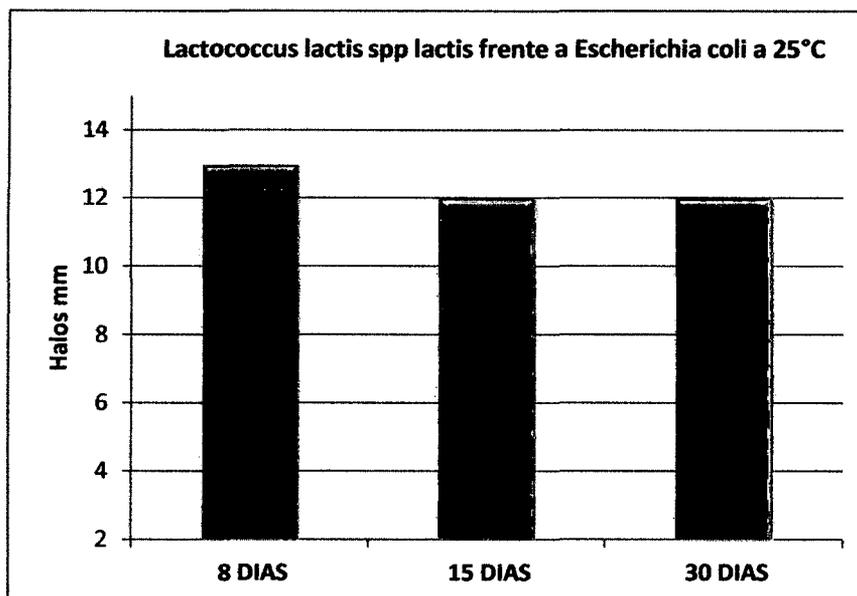
El gráfico 21, muestra que a 25°C la actividad se ve mucho más afectada y el descenso de la acción antagónica de la cepa de *Lactobacillus plantarum* es de 50% tanto para los 15 como 30 días de almacenamiento

Grafico 21. *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli* a 25°C.



En el gráfico 22, se observa que *Lactococcus lactis ssp lactis* muestra un ligero descenso en su actividad (6,67%) respecto a las otras cepas ensayadas a 25°C

Gráfico 22. *Lactococcus lactis ssp lactis* frente a *Escherichia coli* a 25°C.



A continuación se presentan los resultados del ANOVA y la prueba de Tukey B a la que fueron sometidos los datos obtenidos.

Cuadro 18. ANOVA para la influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento de los sobrenadantes libres de células de BAL en la actividad antagónica frente a *Escherichia coli*.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados tipo III	Grados de Libertad	Media cuadrática	F	Sig.
T° de almacenamiento	5,689	2	2,844	0,269	0,765
Tiempo de almacenamiento	11,756	2	5,878	0,556	0,576
T° y Tiempo	1,111	4	0,278	0,026	0,999
Error	856,600	81	10,575		
Total	1494,000	90			

De acuerdo a la tabla de ANOVA:

- Para la temperatura de almacenamiento se aprecia que no existen diferencias significativas. Esta afirmación se deduce por el valor de significancia alcanzada por dicho tratamiento (0,765), que viene a ser mayor al nivel de significancia de 0.05 (95%).
- Para el tiempo de almacenamiento se aprecia que no existen diferencias significativas. Esta afirmación se deduce por el valor de significancia alcanzada por dicho tratamiento (0,576), que viene a ser mayor al nivel de significancia de 0.05 (95%).
- Para la interacción tiempo - temperatura de almacenamiento se aprecia que no existen diferencias significativas. Esta afirmación se deduce por el valor de significancia alcanzada por dicho tratamiento (0,999), que viene a ser mayor al nivel de significancia de 0.05 (95%).

La prueba de Tukey B, muestra un solo subconjunto para los tratamientos de temperatura, es decir, no muestran estadísticamente diferencias significativas, determinando así que la actividad antagónica de los cultivos libres de células de las BAL, no es anulada por el tiempo ni la temperatura de almacenamiento.

Cuadro 19. Prueba de Tukey B para influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento de los sobrenadantes libres de células de BAL en la actividad antagónica frente a *Escherichia coli*.

Escherichia coli			
	Tratamiento	N	Subconjunto
	1		1
Tukey B ^{a,b}	25	30	2,2667
	-20	30	2,8000
	4	30	2,8000

Cristobal (2008), determinó que los extractos de *Lactobacillus plantarum* frente a *Listeria monocytogenes* presentan actividad a una temperatura óptima de conservación de 4°C a 32 °C durante 30 días. Resultados que coinciden con los

obtenidos pues la actividad de esta cepa si bien se ve disminuida no se ve anulada por completo en los rangos de temperatura y tiempo que se realizaron los ensayos. Para el caso de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus pentosus*, frente a *Listeria monocytogenes* la mejor actividad fue a temperaturas de congelación y refrigeración mientras que a 25°C la actividad disminuye pero no desaparece. Resultados similares a los obtenidos por Del Campo y col.; (2008) que trabajaron con extractos de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus pentosus* a temperaturas de almacenamiento de -18°C, 4°C y 30°C y obtuvieron que

Estrada y col., (2005) evaluaron los extractos centrifugados de *Lactobacillus plantarum* frente a *Salmonella* y *Escherichia coli*. Observaron una disminución de la actividad con el tiempo, concluyendo que 0 °C es una temperatura buena de almacenamiento, no solo para la estabilidad del extracto, sino también para la actividad frente a estos microorganismos. Resultados que coinciden con los obtenidos pues se observa que al pasar los días de almacenamiento, la actividad va disminuyendo pero no se anula por completo.

A temperaturas de -20°C y 4°C la actividad antagónica es mucho mayor que a 25°C Aunque esta temperatura exista una buena actividad y estabilidad a lo largo del estudio, Ogunbanwo y col. (2003) obtuvieron resultados similares, donde el extracto a temperaturas de congelación conserva más sus cualidades y su capacidad antagónica.

Lactococcus lactis ssp lactis, es una de las cepas que produce nisina y la producción de esta bacteriocina está determinado por las condiciones de temperatura (entre 22° C y 37°C) y el tiempo de almacenamiento (entre 30 y 60 días) (Roos y col.; 1999); como se observa en los resultados obtenidos, esta cepa fue la que menos descenso en su actividad tuvo frente a *Escherichia coli* y además presentó mejor estabilidad frente a los tiempos de almacenamiento de realizados los ensayos.

3.6 TERMORESISTENCIA DE LOS CULTIVOS LIBRES DE CÉLULAS DE BAL

Después que las diez cepas en estudio fueron sometidas a tratamiento térmico a 121°C por 15 minutos y haber sido evaluada su actividad antagónica, se observó que *Lactobacillus plantarum* presentó actividad frente a *Escherichia*

coli y *Listeria monocytogenes*; mientras que *Lactobacillus brevis* solo frente a *Listeria monocytogenes* y *Lactococcus lactis ssp lactis* solo frente a *Escherichia coli*. Sin embargo, los cultivos libres de células de *Lactobacillus pentosus* fueron totalmente inactivados.

Se comprobó que cuando el cultivo libre de células producido por *Lactobacillus plantarum* es sometido a 121° C, la actividad inhibitoria se conserva; similares resultados mostraron Ivanova y col., (2000) al evaluar la respuesta de la bacteriocina Bozacin 14 producida por una cepa de *Lactococcus lactis* aislada de "boza", una bebida búlgara tradicional a base de cereales.

Todorov y col. (2001) aislaron y caracterizaron parcialmente bacteriocinas de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis subespecie. lactis*. Las bacteriocinas permanecieron activas después de un tratamiento térmico por 20 minutos a 121°C, ningún cambio en la actividad antimicrobiana se reportó después del tratamiento térmico. Todas las bacteriocinas mostraron actividad bacteriostática contra *Listeria monocytogenes*.

En la presente investigación la actividad antagónica se mantuvo del tratamiento, sin embargo se redujo. Los resultados obtenidos permiten calificar a la bacteriocina presentes en los cultivos de la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* como termoestable o termoresistente, con una mayor estabilidad a pH ácido. Resultados similares han sido descritos para bacteriocinas producidas por otras cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Choi y col., 2000; Cheigh y col., 2000; Noonpakdee y col., 2003; Campos y col., 2006). Así por ejemplo, la nisina producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* WNC20 fue totalmente inactivada después ser tratada durante 15 min a 121°C a pH 7, pero no se inactivó a pH 3.0 (Noonpakdee et al., 2003). Por su parte, la lactocina NK24 producida por la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NK24 perdió el 87.5% de su actividad después de ser sometida a 100°C durante 30 minutos, y completamente al ser tratada a 121°C durante 15 min (Choi y col., 2000).

Las bacteriocinas de las BAL son conocidas por ser más activas a valores de pH ácido, lo cual puede reflejar la adaptación de estas sustancias a las condiciones ambientales de las bacterias que la producen (Cintas y col., 2001). Asimismo, la termoestabilidad es común en las bacteriocinas producidas por las BAL, pudiendo ser sensible dependiendo del estado de purificación y de

factores como el pH del medio, la fuerza iónica y la presencia de moléculas protectoras (Medina 1990). Además, esta característica de termoresistencia puede tener relación con su estructura proteica, pequeña y poco compleja (Ganzle y col., 1999).

Debido a que las bacteriocinas presentes en los cultivos de la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* fueron más termoestables a pH de 4.0 y pudieron soportar incluso temperaturas de esterilización (121°C) y temperaturas de congelación, son características determinantes para su potencial aplicación en la industria alimentaria, ya que muchos de los procesos empleados involucran tratamientos térmicos y preservación a bajas temperaturas.

CONCLUSIONES

De los resultados de la presente investigación se concluye:

1. Se aislaron 75 cepas de bacterias ácido lácticas a partir de 14 muestras de quesos frescos de elaboración artesanal. El 13.3 % (10 cepas) de los cultivos libres de células de las bacterias ácido lácticas aisladas mostraron actividad antagónica, de las cuales: *Lactobacillus pentosus* (2 cepas) y *Lactobacillus brevis* (2 cepas) presentaron actividad frente a *Listeria monocytogenes*, *Lactococcus lactis ssp lactis* (1 cepa) presentó frente a *Escherichia coli* mientras que *Lactobacillus plantarum* (5 cepas) tuvieron actividad frente a ambos patógenos.
2. Se determinó que la cepa de *Listeria monocytogenes* es mucho más sensible a los compuestos producidos por las bacterias ácido lácticas mientras que frente a *Escherichia coli* el espectro de actividad será menor.
3. Los pHs a los que fueron sometidos los cultivos libres de células de las BAL, demostraron que su actividad no está solamente vinculada a la producción de ácidos orgánicos, sino a otro tipo de metabolitos producidos por estas bacterias. Los cultivos libres de células, tienen mejor actividad a temperaturas de congelación y refrigeración (-20°C Y 4°C) mientras que a 25°C la actividad se ve disminuida mas no anulada. El tiempo de almacenamiento de los cultivos libres de células a los 8 y 15 días de almacenamiento muestra la misma actividad; pero a los 30 días la actividad disminuye notablemente pero no se ve anulada.
4. El tratamiento térmico al que fueron sometidos los cultivos libres de células de las cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis*, demuestra que los compuestos responsables del antagonismo son termoresistentes.

RECOMENDACIONES

- ✓ Continuar la investigación con las cepas ya aisladas frente a otro tipo de microorganismos y comprobar si su acción bactericida tiene un mayor espectro de inhibición.
- ✓ Las cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus* y *Lactococcus lactis*, pueden ser potencialmente utilizadas en la industria alimentaria como productoras de bacteriocinas
- ✓ Continuar con el estudio de agentes antimicrobianos alternativos ante el incremento de la demanda por el consumo de alimentos minimamente procesados.
- ✓ Emplear técnicas moleculares y de cromatografía para poder determinar la sustancia con el efecto inhibidor que presentan las cepas estudiadas.

LITERATURA CONSULTADA

- Abee T., Rombouts F. Mode of action on nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. Applied and Environmental Microbiology. 1994.
- Adams M., y Moss M. Microbiología de los alimentos. (Eds). Acribia, Zaragoza España. 1998. pp. 321-330.
- Alais C. Ciencia de la leche. Compañía Editorial Continental S. A., México. 1980.
- Allende A., Aguayo E., Ameer, M. y Artés F. Microbiological quality of shredded endive as affected by pre-washing and chlorinated or ozonated water. Food and Agricultural Products: Processing and Innovations. 2007; pp. 24-26.
- Alvarado C., Diaz-Rivero C., Efecto antagónico de *Lactobacillus plantarum* aislado de pastizal de finca lechera. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. 2010.
- Alvarez E. Efectos del *Lactobacillus casei* ATCC 393™ sobre el *Escherichia coli* durante la vida comercial del queso fresco. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero de Alimentos. Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos. Universidad Nacional del Callao. Callao, Perú. 2011.
- Arqués F. Kuipers, O. Siezen, R.J. "Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering" 2004
- Barefoot, S. F., Klaenhammer, T. R. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology. 1983
- Bari M., Ukuku D., Kawasaki T., Inatsu Y., Isshiki K. & Kawamoto, S. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. Journal of Food Protection. 2005.

- Batt R. Heat treatment of foods. Thermal processing required for canning. En: Encyclopedia of Food Microbiology. pp 1008-1016. Oxford, U.K. 2000.
- Bucio, A. G., *Lactobacillus plantarum* 44A as a live feed supplement for freshwater fish. Tesis doctoral, University of Wageningen, Holanda. 2004.
- Campos C., Rodriguez O., Calo-Mata P., Prado M. & Barros, J. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). Food Research International. 2006.
- Casaus P., Cintas M., Rodríguez J, Hernández E., Holo H., and Ness F. Partial biochemical characterization of an enterocin produced by an *Enterococcus faecium* strain of meat origin. Abstract of the 1st Meeting of the EU Biotech Project in LAB Antimicrobial Compounds. 1998.
- Casp A. y Requena A. Procesos de Conservación de Alimentos, Colección de Tecnología de Alimentos. (Eds). Mundi-Prensa, Madrid España 1999; pp. 97-98.
- Charles, A. Ciencia de la Leche, Principios de la Técnica Lechera. (Eds). Continental, México. 1998; pp. 267-302.
- Cheigh C.I., Choi H.J., Kim S.B., and Pyun Y.R. Production of nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi, Journal of Applied Microbiology. 2000
- Chikindas M., García-Garcera M. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. Applied and Environmental Microbiology. 1993.
- Choi H.J., Cheigh C.I., Kim S.B., and Pyun Y.R. Production of nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi, Journal of Applied Microbiology. 2000.
- Chung H. Control of foodborne pathogens by bacteriocin-like substances from *Lactobacillus spp.* in combination with high pressure processing. Ohio State University. Ohio. 2003.

- Cintas L., Casaus M., Herranz, C., Nes, I., Hernández, P. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Scientific Technology International*. 2001. 7:281-305
- Clavel M. Condiciones microbiológicas y aislamiento de bacterias ácido lácticas en quesos artesanales del Estado de Hidalgo. Tesis de licenciatura en Química en Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo – México. 2006.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandez, I., Gómez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C., Y Rodríguez, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*. 1997
- Concha P. Bacterias ácido-lácticas con actividad antibacteriana aisladas de vegetales frescos: Evaluación de su potencial utilización para el bio control de *Listeria monocytogenes* en hortalizas frescas cortadas. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero en Alimentos. Facultad de Ciencias de la salud y de los alimentos. Universidad del Bío-Bío. Chillan, Chile. 2010.
- Cristobal R. Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias. Tesis para optar el grado académico de Magíster en Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 2008.
- Davidson P., Hoover D., Antimicrobial components from lactic acid bacteria. USA. 1993.
- Del Campo M., Cástulo M., Gómez H., Alaníz R. Bacterias Ácido Lácticas con capacidad cntagónica y actividad bacteriocinogénica Aisladas de quesos frescos. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Blvd. Marcelino García Barragán y Calzada Olímpica, S.R. Guadalajara, Jalisco, México. 2008.
- Dos Santos W. Aislamiento y Caracterización de una Bacteriocina Producida por *Pediococcus* sp. 347 de Origen Cárnico. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España. 2007.

- Early, R. Tecnología de los productos lácteos. (Eds). ACRIBIA, Zaragoza España. 2000; pp. 79-99.
- Ennahar S. Class IIa bacteriocinas: Biosynthesis, structure and activity. 2000.
- Entis P., Fung D., Griffiths M. W., McIntre L., Russell S., Sharpe A y Tortorello, M. Rapid Methods for Detection, Identification, and Enumeration. En: Compendium of methods for the microbial examination of foods. 4ª edición, Pouch, American Public Health Association, Washington, EE UU. 2001.
- Estepar, J., Del Mar Sánchez, M., Alonso, L. Y Mayo, B. Biochemical and microbiological characterization of artisanal 'Peñamellera' cheese: análisis of its indigenous lactic bacteria. International Dairy journal. 1999
- Estrada A., Gutiérrez L., Montoya I. Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. Contra *Salmonella* sp. *Escherichia coli*. Medellín. Colombia. 2005.
- Fernández E. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México. 2000; pp. 105-110.
- Frazier W y Westhoff D. Microbiología de los alimentos, Cuarta edición. (Eds) ACRIBIA, Zaragoza, España. 2000; pp. 61-64.
- Funel A. *Leuconostoc*. Bordeaux. 1999. [Citado julio 25 de 2014] <http://www.foodscience.cornell.edu>
- Ganzle, M. G., C. Hertel, J. M. B. M. van der Vossen y W. P. Hammes. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. Int. J. Food Microbiol. 1999.
- García J. Identificación de Bacterias Ácido Lácticas mediante perfiles de Fermentación y Ribotipificación. Tesis para optar el título profesional de Químico de Alimentos. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo, México. 2007.
- Garrity G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The taxonomic Outline of Bacteria and Archaea. Segunda Edición. 2005

- González B., Gómez M., y Jiménez Z. Bacteriocinas de probióticos. En: RESPYN Revista de salud pública y nutrición. Vol 4 No. 2 Abril/Junio. México.2003.
- González-Martínez, B. E., Gómez-Treviño, M. y Jiménez-Salas, Z., Bacteriocinas de probióticos. 2003.
- Herrera, V. *Evaluación de la producción de nisina a partir de Lactococcus Lactis. Subs. Lactics.* Medellín, Colombia: Tesis doctoral. Universidad Pontificia Bolivariana. 2009.
- Hernández, D., Cardell, E. y Zárate, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711. 2004
- Holzapfel, W. H; Geisen, R. and Schillinger, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures bacteriocins and food-grade enzymes. International Journal Food Microbiology. 1995.
- IBM SPSS. Statistical Product and Service Solutions. Version 21. 2012.
- Inda A.. Optimización del rendimiento y Aseguramiento de Inocuidad en la Industria de Quesería. Proyecto OEA/GTZ de Gestión de la Calidad en la Pequeña y Mediana Empresa (PYMEs). Lima. 2000.
- Instituto Nacional de Ciencias Biológicas. (INCB). "Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria", Departamento de microbiología, 6° Edición. 2002
- Jack, R.W., Tagg, J.R. y Ray, B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. 1995.
- Jay J. Microbiología Moderna de los Alimentos, 4ª Edición. (Eds). Acribia, Zaragoza, España. 2000
- Joerger R. Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. Poultry Science. 2003; 82, 640-647
- Kandler, O., N. Weiss, 1986. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1986.
- Klaenhammer, T.R. y Kullen, M.J. Selection and design of probiotics. International Journal of Food Microbiology. 1999

- Lapage S.P., Shelton I.E., Mitchell. T.G. and Mackenzie. A.R.. "Culture collection and the preservation of bacteria". Methods in Microbiology. Vol. 3. Academic Press. Londres. 1970
- Leroy F., Degeest B. y De Vuyst L. A novel area of predictive modeling: describing the functionality of beneficial microorganisms in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2002. 73: 251-259.
- Ligocka A y Paluszak Z. Capability of lactic acid bacteria to inhibit pathogens in sewage sludge subjected to biotechnological processes. Departamento de Microbiología, University of Technology and Agriculture. 2004. 49, 23-27.
- Ligocka, A. y Paluszak, Z. Capability of lactic acid bacteria to inhibit pathogens in sewage sludge subjected to biotechnological processes. Departamento de Microbiología, University of Technology and Agriculture. Bull Vet Inst Pulawy 2004.
- Lyhs U. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki. 2002; pp. 9-10.
- Madigan M., Martinko J., Parker J. Brock. Biología de los Microorganismos. Prentice Hall. 8a. 2001. pp. 70-81.
- Madrid A. Curso de Industrias Lácteas. 1era Edición. Madrid, España: Editorial Mundi-Prensa. 1996.
- Manual API 50 CH. BIOMERIUX. Francia. 2012
- Martín, A. Capacidad Antagonista Frente a *Listeria monocytogenes* de dos sustancias tipo bacteriocina utilizadas en combinación con NaCl y CO₂. Tesis de la Universidad Austral de Chile. 2002
- Medina M. Una posible razón puede ser porque fueron elaborados artesanalmente, es decir, su fermentación es espontánea y no por la adición de cultivos iniciadores. 1990.
- Mossel, D. A. A., Moreno, B. y Struijk, C. B., Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia, España. 2003.

- Murry, A.C., Hinton, A. y Morrison, H. 2004. Inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridia perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. 2004
- Neria A. Evaluación de la capacidad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos. Tesis para optar el título profesional de Químico de Alimentos. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo, México. 2006.
- Nieto L., Donolo A., Bava A., y Yantorno O. Empleo de espectroscopia infrarroja-transformada de Fourier para diferenciar bacterias de importancia clínica. Acta Bioquímica. Clínica. Latinoamericana. 2004. 38 (3); pp. 289-295
- Noonpakdee W., Santivarangkna C., Jumriangrit P., Sonomoto K. y Panyim, S. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. International Journal of Food Microbiology, 2003; 81, pp. 137-45.
- Ogunbanwo S., Sanni A., Onilude A. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1, Journal of Biotechnology. 2003; 2, pp. 219-227.
- O'Hara C., Weinstein M. y Miller J. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms, En: Manual of clinical microbiology, 8ª edición. 2003
- Orozco, L. R. Algunos factores que afectan la inocuidad microbiana del queso Oaxaca durante su elaboración y almacenamiento. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Queretaro, Mexico. 1999.
- Ortiz M. Identificación Bioquímica de Bacterias Ácido Lácticas Aisladas a partir de Productos Lácteos en el Estado De Hidalgo. Tesis para optar el título profesional de Químico de Alimentos. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo, México. 2006.
- Paik H.D., Bae S.S., Park S.H., and Pan J.G. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus*

thuringiensis subsp tochiensis, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2001

- Piard J. y Desmazeud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances. *International Journal of Food Microbiology*. 1992. 72:113-142.
- Prescott L., Harley J., y Klein D. Microbiología, Cuarta edición. (Eds). Mc Graw Hill Interamericana, Zaragoza España. 1999; pp. 955-957.
- Raloff J. Staging germ warfare in foods. 1998.
- Ramirez M. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis para optar el título profesional de Licenciado Químico en Alimentos. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo, México. 2005.
- Randazzo C. L., Pitino I., Scifo, G y Caggia C. Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. *Food Control*. 2009; 20, pp. 756-763.
- Revista de Microbiología 1995.
- Riley M. Bacteriocins: Evolution, ecology and application. 2002.
- Rodriguez J., Torres L. Evaluación de sustancias antimicrobianas presentes en extractos obtenidos de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. Proyecto de grado para optar al título de Ingeniero de Producción Agroindustrial. Facultad de Ingeniería de Producción Agroindustrial. Universidad de la Sabana. Bogota, Colombia. 2006.
- Roos, R.P., Galvin, M., Mc Auliffe, O., Morgan, S.M., n, M.P., Twomey, D.P., Meaney, W.J., Hill, C. 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. 1999
- Salminen S., Wright A., Ouwehand, A. Lactic Acid Bacteria. Third edition. Editorial Board. 2004.
- Schillinger U., Geisen R. y Holzapfel W. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science & Technology* 1996. 25: 158-164.

- Scientific Status Summary. Bacteria Associated with Foodborne Diseases, report of the *Institute of Food Technologists*, Washington, D.C. 2004; pp. 1-25.
- Settanni L., y Corsetti A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 2008; 121, pp. 123–138.
- Soomro H., Masud T. y Anwaar K. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB). in Food Preservation and Human Health—A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 2004.1: 20-24.
- Stiles M., Holzapfel W. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 1997. 36:1-29.
- Stryer, L.,. *Bioquímica*. 3er edición, Editorial Reverte, España. 1990.
- TAGG, J., McGIVEN, A. Assay system for bacteriocins. *Microbiologia Aplicada*. 1971.
- Torres V., Agentes Patógenos Transmitidos por los Alimentos. Vol. I Universidad de Guadalajara. México. 2002.
- Trias R., Bañera LI., Montesinos E. & Badosa, E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 2008. pp. 231-236.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos, P., Kersters, K. y Swings, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*. 1996; 60: 407-438.
- Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *CMR*. 2001.
- Villegas De Gonte A. Tecnología de alimentos de origen animal: Manual de prácticas. México D.F: editorial Trillas. 2009.
- Wigley, R.C. Starter cultures. Uses in the food industry. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford, U.K. 1999.
- Ivanova, I., Dajavnova, O., Panev, O. Detection, purification and partial characterization of antimicrobial substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from Boza, traditional bulgarian beverage. *Biocatalyst: Fundamentals and advances*. 2000.

- Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Ivanova, I And Dousse, X. Detection and characterization of novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST31 isolated from sourdough. 2001.
- www.cfsan.fda.gov. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. 2005.

ANEXOS

Anexo 1. Conteo de Bacterias Acido Lácticas

MEDIO/ TEMPERATURA	CÓDIGO DE MUESTRA	DIAS DE MADURACION	UFC/ml	PROMEDIO LOG ₁₀ (UFC/ml)
MRS 31 ± 1°C	Queso fresco 01	01	6 x 10 ⁷	7.77
MRS 31 ± 1°C	Queso fresco 02	01	5,5 x 10 ⁷	7.75
MRS 31 ± 1°C	Queso fresco 03	01	4,5 x 10 ⁷	7.65
MRS 31 ± 1°C	Queso fresco 04	02	3.8 x 10 ⁸	8.60
MRS 31 ± 1°C	Queso fresco 05	01	5,9 x 10 ⁷	7.78
MRS 31 ± 1°C	Queso fresco 06	01	6.2 x 10 ⁷	7.80
MRS 31 ± 1°C	Queso fresco 07	02	5,8 x 10 ⁷	7.76
MRS 31 ± 1°C	Queso fresco 08	01	3,5 x 10 ⁸	8.54
BAL	Queso fresco 09	01	4 x 10 ⁸	8.60
MRS 31 ± 1°C	Queso fresco 10	01	2,3 x 10 ⁸	8.36
MRS 31 ± 1°C	Queso fresco 11	02	2,5 x 10 ⁸	8.39
MRS 31 ± 1°C	Queso fresco 12	02	3,2 x 10 ⁸	8.50
MRS 31 ± 1°C	Queso fresco 13	02	2,9 x 10 ⁸	8.46
MRS 31 ± 1°C	Queso fresco 14	01	6,5 x 10 ⁷	7.81

Anexo 2. Actividad antagónica de las BAL frente a *Listeria monocytogenes*.

CEPA	pH 4,0	pH 6,5	pH 8,0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9 mm	5 mm	4 mm
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9 mm	5 mm	4 mm
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9 mm	5 mm	4 mm
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9 mm	5 mm	4 mm
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9 mm	5 mm	4 mm
<i>Lactobacillus brevis</i>	11 mm	5 mm	5 mm
<i>Lactobacillus brevis</i>	10 mm	4 mm	4 mm
<i>Lactobacillus pentosus</i>	10 mm	5 mm	4 mm

<i>Lactobacillus pentosus</i>	9 mm	4 mm	4 mm
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	0 mm	0 mm	0 mm

Anexo 3. Actividad antagónica de las BAL frente a *Escherichia coli*.

CEPA	pH 4,0	pH 6,5	pH 8,0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4 mm	2 mm	1 mm
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4 mm	2 mm	1 mm
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4 mm	2 mm	1 mm
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4 mm	2 mm	1 mm
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4 mm	2 mm	1 mm
<i>Lactobacillus brevis</i>	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Lactobacillus brevis</i>	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Lactobacillus pentosus</i>	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Lactobacillus pentosus</i>	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	15 mm	11 mm	10 mm

Anexo 4. Influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre el efecto antagónico de los cultivos libres de células de BAL frente a *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*.

CEPA	T°	INDICADOR	HALOS DE INHIBICIÓN 8 DIAS	HALOS DE INHIBICIÓN 15 DIAS	HALOS DE INHIBICIÓN 30 DIAS
FM 14 <i>Lactobacillus brevis</i>	-20	<i>Listeria monocytogenes</i>	11 mm	9 mm	7 mm
		<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm
FM 30 <i>Lactobacillus brevis</i>	-20	<i>Listeria monocytogenes</i>	10 mm	8 mm	6 mm
		<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm
FM 37 <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	-20	<i>Listeria monocytogenes</i>	0 mm	0 mm	0 mm
		<i>Escherichia coli</i>	15 mm	14 mm	14 mm
FM 38 <i>Lactobacillus</i>	-20	<i>Listeria monocytogenes</i>	10 mm	9 mm	7 mm

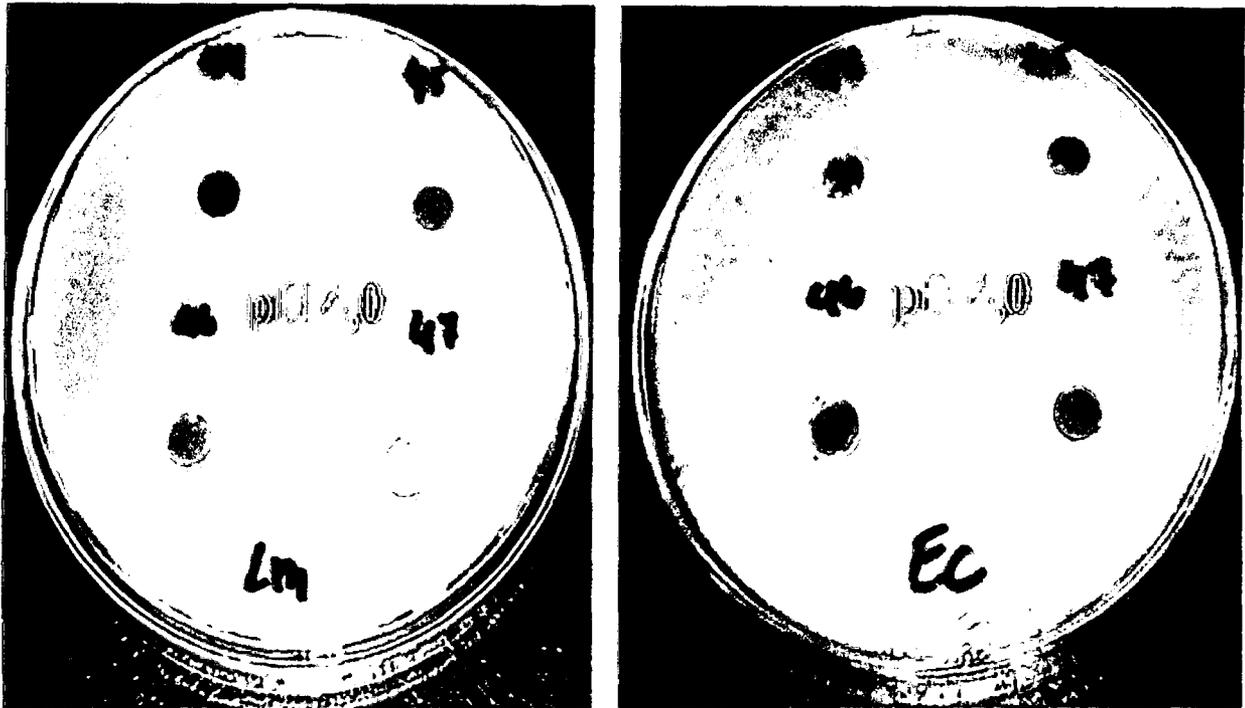
<i>pentosus</i>		<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm
FM 39 <i>Lactobacillus pentosus</i>	-20	<i>Listeria monocytogenes</i>	10 mm	9 mm	7 mm
		<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm
FM 41 <i>Lactobacillus plantarum</i>	-20	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	7 mm	7 mm
		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	3 mm	3 mm
FM 44 <i>Lactobacillus plantarum</i>	-20	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	7 mm	7 mm
		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	3 mm	3 mm
FM 45 <i>Lactobacillus plantarum</i>	-20	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	7 mm	7 mm
		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	3 mm	3 mm
FM 46 <i>Lactobacillus plantarum</i>	-20	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	7 mm	7 mm
		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	3 mm	3 mm
FM 47 <i>Lactobacillus plantarum</i>	-20	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	7 mm	7 mm
		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	3 mm	3 mm

CEPA	T°	INDICADOR	HALOS DE INHIBICIÓN 8 DIAS	HALOS DE INHIBICIÓN 15 DIAS	HALOS DE INHIBICIÓN 30 DIAS
FM 14 <i>Lactobacillus brevis</i>	4	<i>Listeria monocytogenes</i>	11 mm	9 mm	7 mm
		<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm
FM 30 <i>Lactobacillus brevis</i>	4	<i>Listeria monocytogenes</i>	10 mm	8 mm	6 mm
		<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm
FM 37 <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	4	<i>Listeria monocytogenes</i>	0 mm	0 mm	0 mm
		<i>Escherichia coli</i>	15 mm	14 mm	14 mm
FM 38 <i>Lactobacillus pentosus</i>	4	<i>Listeria monocytogenes</i>	10 mm	9 mm	9 mm
		<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm
FM 39 <i>Lactobacillus pentosus</i>	4	<i>Listeria monocytogenes</i>	10 mm	9 mm	7 mm
		<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm
FM 41 <i>Lactobacillus plantarum</i>	4	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	7 mm	7 mm
		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	3 mm	3 mm
FM 44 <i>Lactobacillus plantarum</i>	4	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	7 mm	7 mm
		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	3 mm	3 mm
FM 45 <i>Lactobacillus</i>	4	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	7 mm	7 mm

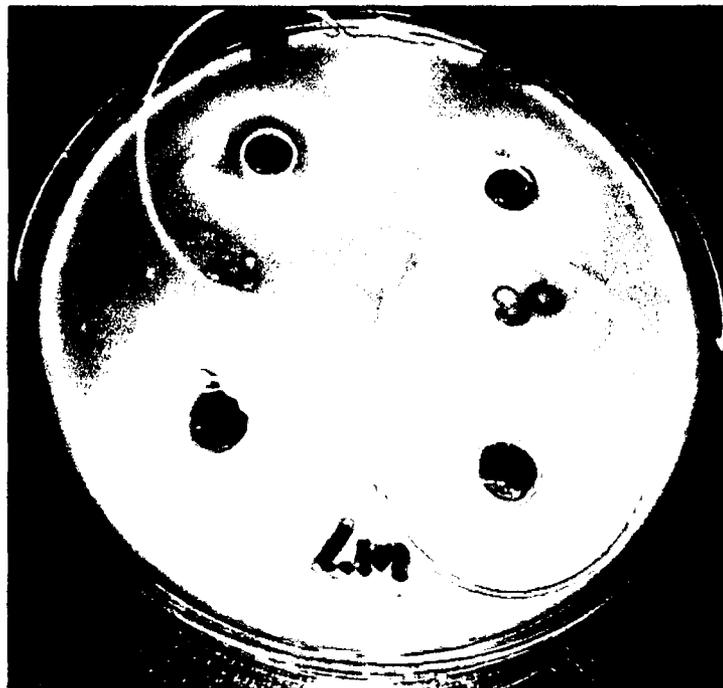
<i>plantarum</i>		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	3 mm	3 mm
FM 46 <i>Lactobacillus plantarum</i>	4	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	7 mm	7 mm
		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	3 mm	3 mm
FM 47 <i>Lactobacillus plantarum</i>	4	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	7 mm	7 mm
		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	3 mm	3 mm

CEPA	T°	INDICADOR	HALOS DE INHIBICIÓN 8 DIAS	HALOS DE INHIBICIÓN 15 DIAS	HALOS DE INHIBICIÓN 30 DIAS
FM 14 <i>Lactobacillus brevis</i>	25	<i>Listeria monocytogenes</i>	11 mm	7 mm	3 mm
		<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm
FM 30 <i>Lactobacillus brevis</i>	25	<i>Listeria monocytogenes</i>	10 mm	7 mm	3 mm
		<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm
FM 37 <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	25	<i>Listeria monocytogenes</i>	0 mm	0 mm	0 mm
		<i>Escherichia coli</i>	13 mm	12 mm	12 mm
FM 38 <i>Lactobacillus pentosus</i>	25	<i>Listeria monocytogenes</i>	10 mm	8 mm	6 mm
		<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm
FM 39 <i>Lactobacillus pentosus</i>	25	<i>Listeria monocytogenes</i>	10 mm	8 mm	6 mm
		<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm	0 mm
FM 41 <i>Lactobacillus plantarum</i>	25	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	4 mm	2 mm
		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	2 mm	2 mm
FM 44 <i>Lactobacillus plantarum</i>	25	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	4 mm	2 mm
		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	2 mm	2 mm
FM 45 <i>Lactobacillus plantarum</i>	25	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	4 mm	2 mm
		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	2 mm	2 mm
FM 46 <i>Lactobacillus plantarum</i>	25	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	4 mm	2 mm
		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	2 mm	2 mm
FM 47 <i>Lactobacillus plantarum</i>	25	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 mm	4 mm	2 mm
		<i>Escherichia coli</i>	4 mm	2 mm	2 mm

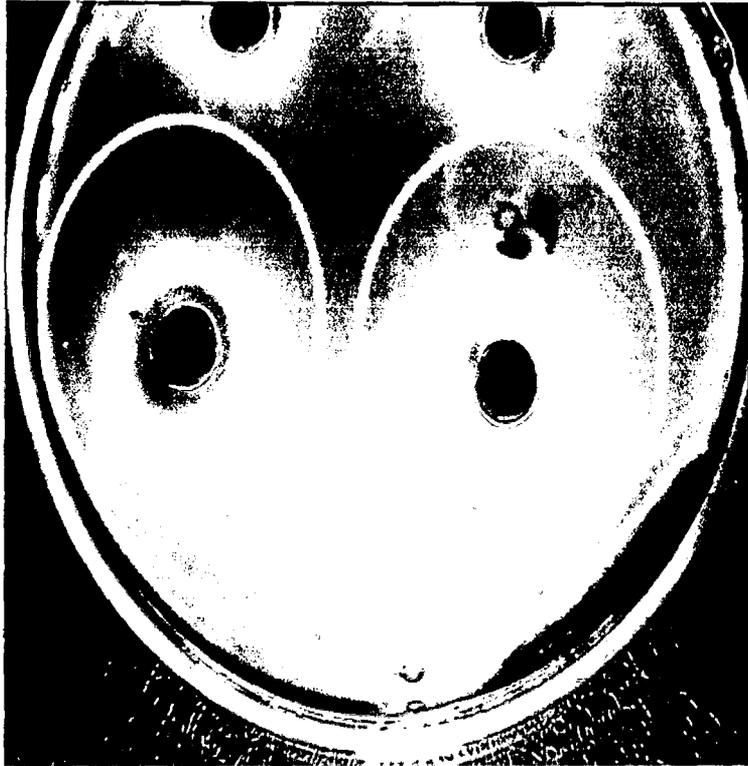
Anexo 5. Influencia del pH en la actividad inhibitoria de los cultivos libres de células de las BAL aisladas



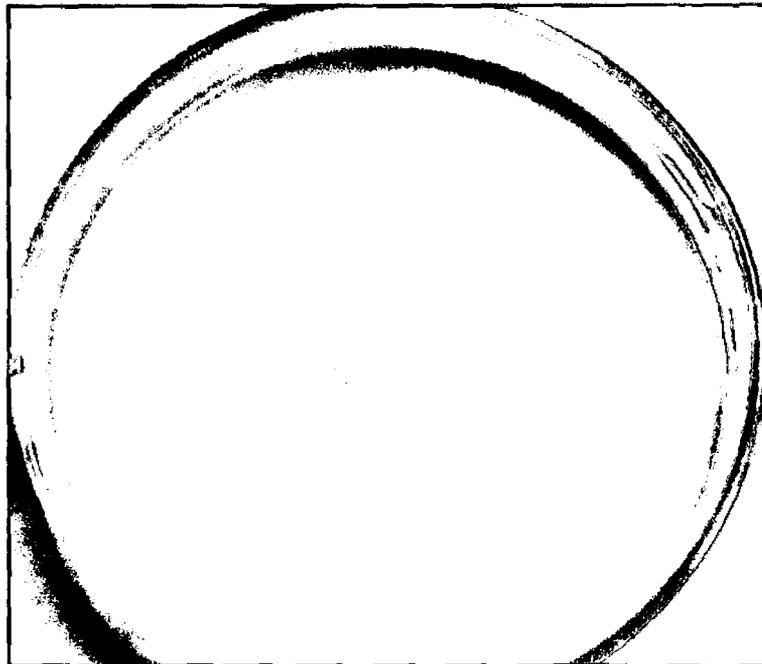
Halos de inhibición producidos por *Lactobacillus plantarum* a pH 4,0 frente a *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*.



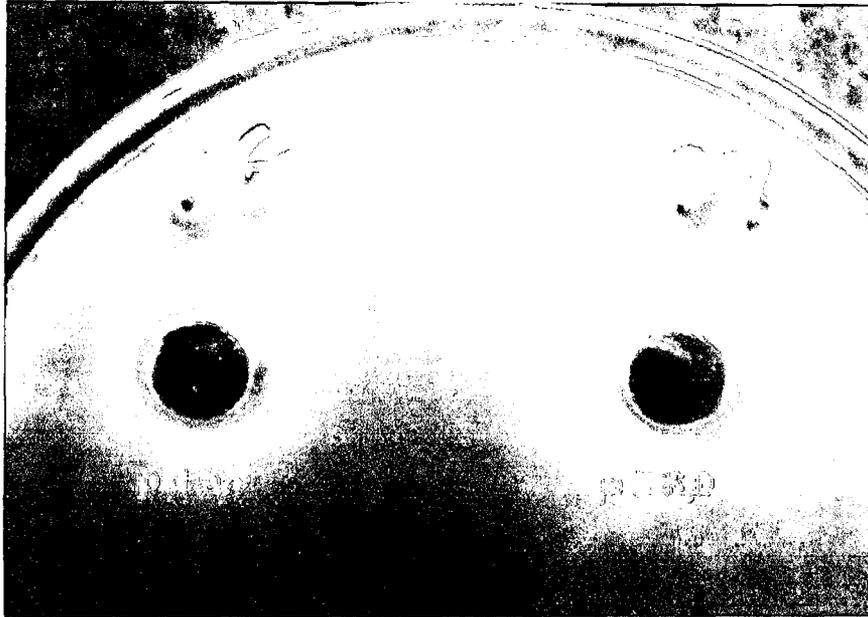
Halos de inhibición producidos por *Lactobacillus brevis* FM 14 y *Lactobacillus brevis* FM 30 frente a *Listeria monocytogenes*



Halos de inhibición producidos por *Lactobacillus pentosus* FM 38 y *Lactobacillus pentosus* FM 39 frente a *Listeria monocytogenes*



Halos de inhibición producido por *Lactococcus lactis ssp lactis* frente a *Escherichia coli*.



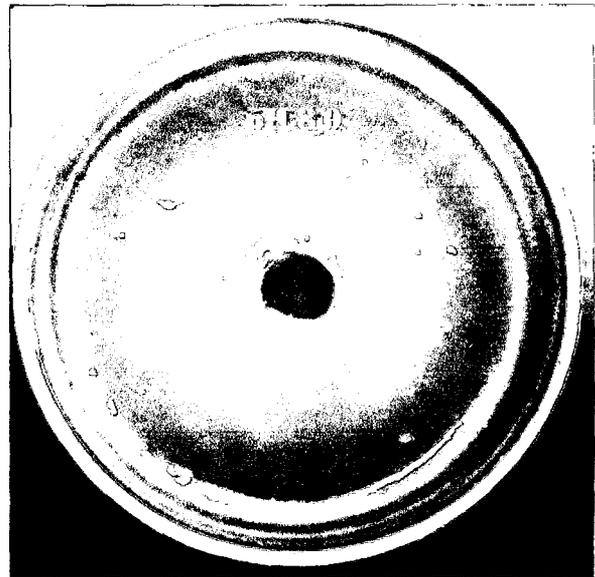
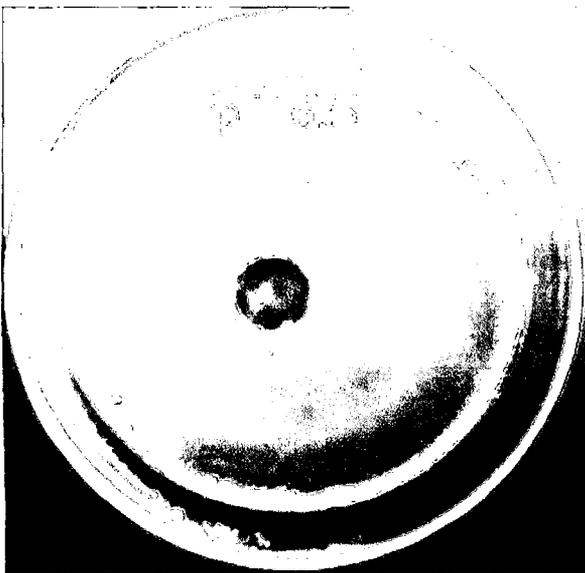
Halos de inhibición producido por *Lactobacillus pentosus* frente a *Listeria monocytogenes* a pH 6,5 y 8,0



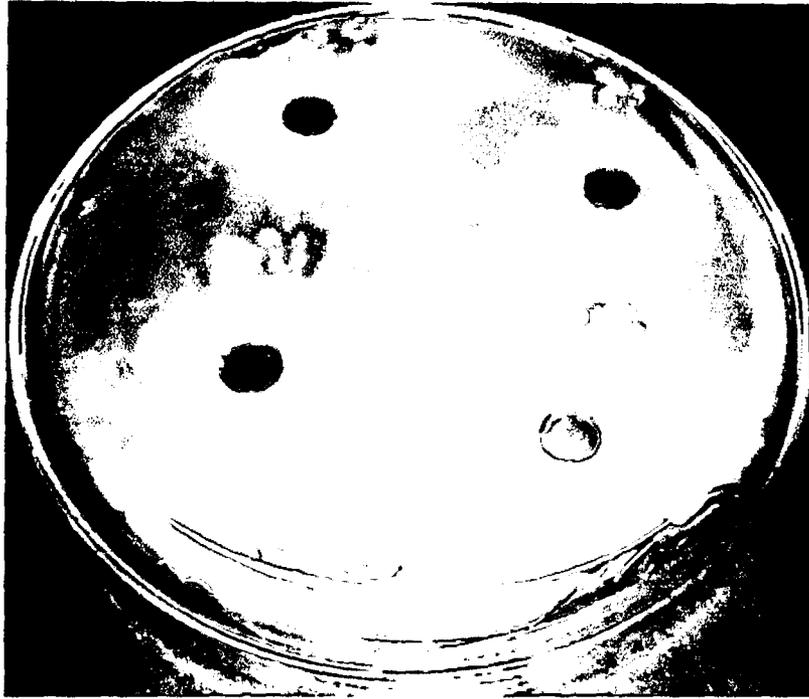
Halos de inhibición producido por *Lactobacillus plantarum* frente a *Listeria monocytogenes* a pH 6,5 y 8,0



Halos de inhibición producido por *Lactobacillus brevis* frente a *Listeria monocytogenes* a pH 6,5 y 8,0

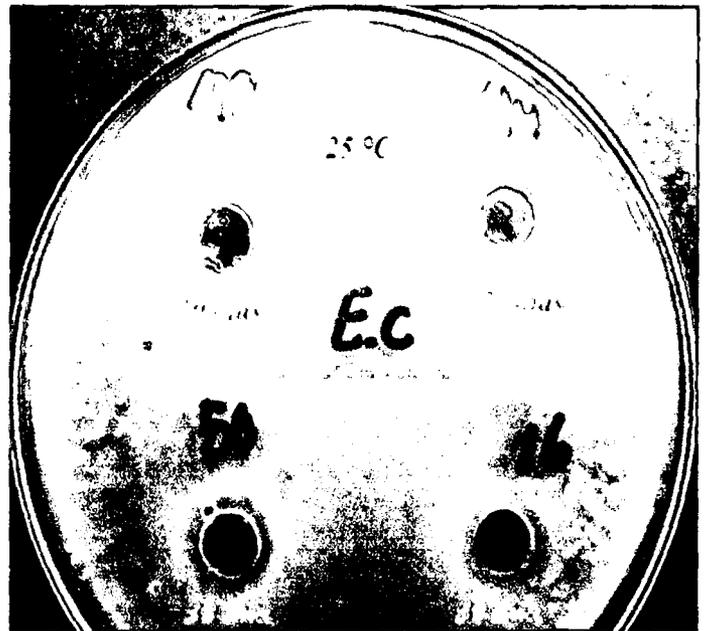


Halos de inhibición producido por *Lactococcus lactis ssp lactis* frente a *Escherichia coli* a pH 6,5 y 8,0

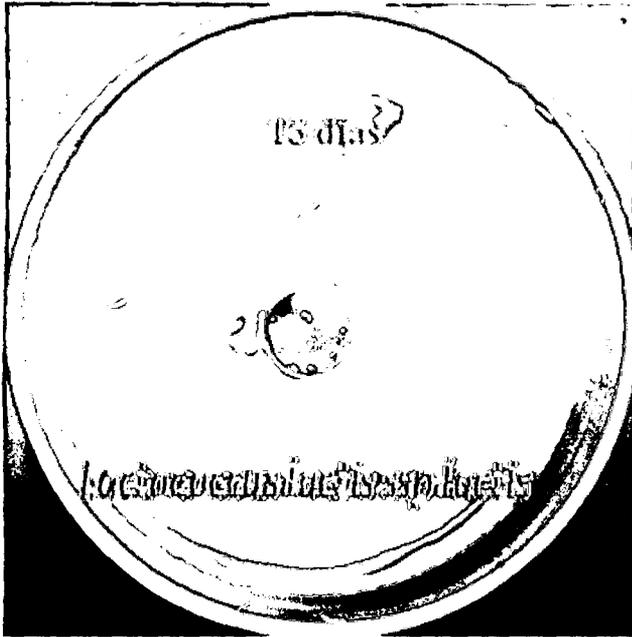


Halos de inhibición producido por *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli* a pH 6,5 y 8,0.

Anexo 6. Influencia del tiempo de almacenamiento en la actividad antagónica de los cultivos libres de células de las BAL aisladas.



Halos de inhibición producidos por *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli* a los 15 y 30 días de tratamiento.



Halos de inhibición producidos por *Lactococcus lactis ssp actis* frente a *Escherichia coli* a los 15 y 30 días de tratamiento.

Anexo 7 Perfiles de identificación de las cepas con el programa API WEB.

bioMerieux Argentina - Buenos Aires **Yapiweb**

API 50 CHL V5.1 [Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FM14 48HRS FECHA 7/06/14

COMENTARIO

EXCELENTE IDENTIFICACION

Galería	API 50 CHL V5.1
Perfil
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactobacillus brevis 1	99.9	0.85	SOR 14%			

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactococcus raffinolactis			RIB 16%	SOR 0%	AMD 100%	TAG 1%

API 50 CHL V5.1 [Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FM30 48HRS FECHA 7/06/14

COMENTARIO

BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO

Galería	API 50 CHL V5.1
Perfil
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactobacillus brevis 1	75.3	0.41	SOR 14%	MDM 0%	MLZ 14%	GNT 85%
			2KG 20%	5KG 14%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactobacillus plantarum 1			DXYL 2%	LAC 99%	2KG 0%	5KG 0%

API 50 CHL V5.1		Impresora	Exportar	Nuevo test	Modificar
REFERENCIA	FECHA				
FM41 48HRS	7/06/14				
COMENTARIO					
MUY BUENA IDENTIFICACION					
Galería	API 50 CHL V5.1				
Perfil+++++++.....+++++++.....+++++++.....+++++++.....+++++++.....				
Nota					
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra		
Lactobacillus plantarum 1	99.9	0.62	DXYL 2%	TAG 7%	
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra		
Lactobacillus pentosus	0.1	0.17	GLY 75%	RHA 25%	MDM 1%
			TAG 1%	DARL 0%	MLZ 25%

API 50 CHL V5.1		Impresora	Exportar	Nuevo test	Modificar
REFERENCIA	FECHA				
FM 39 48HRS	9/06/14				
COMENTARIO					
BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO					
Galería	API 50 CHL V5.1				
Perfil+++++++.....+++++++.....+++++++.....+++++++.....+++++++.....				
Nota					
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra		
Lactobacillus pentosus	75.3	0.4	GLY 75%	MLZ 25%	TAG 1%
Lactobacillus plantarum 1	23.8	0.41	DXYL 2%	TAG 7%	
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra		
Lactobacillus brevis 1	0.8	0.33	SOR 14%	MLZ 14%	TAG 14%

API 50 CHL V5.1		Impresora	Exportar	Nuevo test	Modificar
REFERENCIA	FECHA				
FM44 48HRS	7/06/14				
COMENTARIO					
EXCELENTE IDENTIFICACION					
Galería	API 50 CHL V5.1				
Perfil	-----+-----++++-----+-----+++++++-----+-----				
Nota					
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra		
Lactobacillus plantarum 1	99.9	0.85	SOR 78%		
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra		
Lactobacillus brevis 1	0.1	0.14	RHA 0%	MDM 0%	MLZ 14% GNT 85%

API 50 CHL V5.1		Impresora	Exportar	Nuevo test	Modificar
REFERENCIA	FECHA				
FM45 48HRS	7/06/14				
COMENTARIO					
EXCELENTE IDENTIFICACION EN EL GENERO					
Galería	API 50 CHL V5.1				
Perfil	-----+++-----++++-----+-----+++++++-----+-----				
Nota					
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra		
Lactobacillus plantarum 1	74.4	0.81	DXYL 2%		
Lactobacillus pentosus	25.5	0.71	GLY 75%	MDM 1%	MLZ 25%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra		
Lactobacillus brevis 1	0.1	0.34	SOR 14%	MDM 0%	MLZ 14% TUR 14%
			GNT 85%		

API 50 CHL V5.1		Impresora	Exportar	Nuevo test	Modificar
REFERENCIA	FECHA				
FM46 48HRS	7/06/14				
COMENTARIO					
EXCELENTE IDENTIFICACION EN EL GENERO					
Galería	API 50 CHL V5.1				
Perfil	-----++++-----++++-----++++++++-----++++-----				
Nota					
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra		
Lactobacillus plantarum 1	74.4	0.81	DXYL 2%		
Lactobacillus pentosus	25.5	0.71	GLY 75%	MDM 1%	MLZ 25%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra		
Lactobacillus brevis 1	0.1	0.34	SOR 14%	MDM 0%	MLZ 14%
			GNT 85%		TUR 14%

API 50 CHL V5.1		Impresora	Exportar	Nuevo test	Modificar
REFERENCIA	FECHA				
FM47 48HRS	7/06/14				
COMENTARIO					
EXCELENTE IDENTIFICACION EN EL GENERO					
Galería	API 50 CHL V5.1				
Perfil++++.....++++.....++++.....++++.....++++.....				
Nota					
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra		
Lactobacillus plantarum 1	99.9	0.24	DXYL 2%	FRU 100%	SKG 0%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra		
Lactobacillus pentosus	0.1	0.0	GLY 75%	FRU 100%	RHA 25%
			MLZ 25%	DARL 0%	SKG 0%



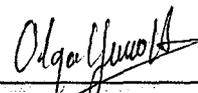
**M. SC. MARTHA N. MOSTAJO-ZAVALITA
PRIMER REPLICANTE**



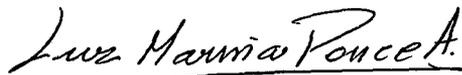
**BLGO. LUIS AYMA CORNEJO
SEGUNDO REPLICANTE**



**DRA. HELDY YIYI ESPINOZA CARRASCO
PRIMER DICTAMINANTE**



**BLGA. OLGA LIBIA CJUNO HUANCA
SEGUNDO DICTAMINANTE**



**M. Sc. LUZ MARINA PONCE ARANÍBAR
ASESORA**

CERTIFICADO CEPAS ATCC



ATCC

Product Sheet

***Escherichia coli* (ATCC®
8739™)**

Please read this FIRST



Storage Temp
Frozen: -80°C or
colder
Freeze-Dried: 2°C
to 8°C
Live Culture: See
Propagation
Section



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Escherichia coli* (ATCC® 8739™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20105 USA
www.atcc.org

800.633.6597 or 703.385.2700
Fax: 703.385.2760
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Description

Designation: Crooks

Deposited Name: *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers

Product Description: Used as a preparatory test control, testing of antimicrobial handwashing formulations, assay of antimicrobial preservatives, and media testing. Genome sequenced strain.

Propagation

Medium

Medium 3: Nutrient agar or nutrient broth

Growth Conditions

Temperature: 37°C

Atmosphere: Aerobic

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. Using a single tube of #3 broth (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a Pasteur or 1.0 mL pipette. Rehydrate the entire pellet.
3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.
4. Use several drops of the suspension to inoculate a #3 agar slant and/or plate.
5. Incubate the tubes and plate at 37°C for 24 hours.

Notes

Three colony types exist on #3 agar: 1.) Circular, flat, rough, spreading. 2.) Entire, circular, smooth, convex, glistening. 3.) Irregular, umbonate, smooth, glistening.

Available as a certified reference material ATCC® CRM-8739™ and ATCC® 8739D-5™.

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this

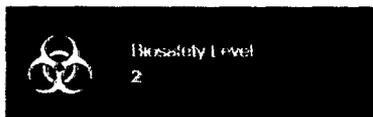
CERTIFICADO CEPAS ATCC



Product Sheet

Listeria monocytogenes (ATCC® 19118™)

Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Listeria monocytogenes* (ATCC® 19118™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2

Description

Designation: Li 2109
Deposited Name: *Listeria monocytogenes* (Murray et al.) Pirie
Antigenic Properties: Serotype 4e

Propagation

Medium
Medium 44: Brain Heart Infusion Agar/Broth

Growth Conditions
Temperature: 37.0°C

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. Using a single tube of #44 broth (5 to 6 ml), withdraw approximately 0.5 to 1.0 ml with a Pasteur or 1.0 ml pipette. Rehydrate the entire pellet.
3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.
4. Use several drops of the suspension to inoculate a #44 agar slant and/or plate.
5. Incubate the tubes and plate at 37°C for hours.

Notes

Colonies on #44 are entire, glistening, circular, smooth, raised, and translucent. Strain exhibits β -hemolysis on sheep blood agar.

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 2

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2013. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [01/14]