



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS**

---

---

**LICENCIATURA EN QUÍMICA EN ALIMENTOS**

**ACTIVIDAD INHIBITORIA DE CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO  
LÁCTICAS FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS Y  
DETERIORADORAS DE ALIMENTOS**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LIC. QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**MARÍA DEL SOCORRO RAMÍREZ CUENCA**

**ASESORES: M en C. IRAIS SÁNCHEZ ORTEGA  
DRA. ARMIDA ZÚÑIGA ESTRADA**

**PACHUCA DE SOTO, HIDALGO**

**2005**

**El presente trabajo se presentó en el VII Congreso de ciencias de los Alimentos y en el XI Congreso Nacional de Biotecnología y bioingeniería AC.**

## *Dedicatorias*

- ✿ Dedico este trabajo en primer lugar a mi sobrino Miguelito<sup>†</sup>, por cuidarme e iluminar mi camino. Siempre estarás en mi corazón.
- ✿ A mis padres Benigno y Thelma, por que con sus sabios consejos, comprensión y sobre todo amor han guiado cada etapa de vida. Los quiero mucho.
- ✿ A mis sobrinos Lupita, Arturo y Omar, por los momentos que me hacen reír y disfrutar su compañía.
- ✿ A mis hermanos Gabino, Ana, Pati, Flor, Miguel y Ana, por su cariño y apoyo incondicional. Los quiero mucho.
- ✿ A Oscar y Magos, por que no hace falta tener los mismos lazos de sangre para tener hermanos.
- ✿ A mi amiga Ale, por demostrarme el significado de una verdadera amiga. Nunca olvidare las risas, lágrimas y desvelos compartidos. Gracias por los hermosos recuerdos y detalles que me ha brindado tu amistad. Te quiero mucho.
- ✿ A mis amigos Omar, Cerón, Temo y Nahum, por su invaluable amistad y compañía, por que su amistad ha sido y será siempre una parte importante en mi vida. Gracias por su apoyo y ayuda durante toda la carrera. Los quiero mucho.
- ✿ A la M en C. Irais Sánchez Ortega, por que me ha brindado su apoyo, confianza y amistad. Gracias por la ayuda otorgada durante la realización de mi tesis.
- ✿ A Eva e Iván, por su amabilidad, apoyo y ayuda.

## *Agradecimientos*

- ✿ A la M en C. Irais Sánchez Ortega y la Dra. Eva María Santos por su paciencia y por la confianza otorgada al brindarme la oportunidad de realizar mi tesis.
  
- ✿ A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por la beca otorgada durante la realización de este trabajo.
  
- ✿ A mi compañera Aide Neria, gracias por su ayuda, compañía y amistad durante la realización de este trabajo.
  
- ✿ A los integrantes del jurado, M en C. Irais, Dra. Eva, Dra. Armida, Dr. Javier, Dra. Alma Delia, Dra. Angélica y Q. en A. Eduardo. Gracias por brindarme sus conocimientos.
  
- ✿ A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología por su amistad y apoyo.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1. Bacterias ácido lácticas	3
2.1.1. Características generales	3
2.1.2. Metabolismo de los carbohidratos	5
2.1.3. Géneros de las BAL	8
2.1.4. Importancia de las BAL	11
2.1.4.1. Cultivos iniciadores	11
2.1.4.2. Probióticos	12
2.1.4.3. Deterioro de los alimentos	12
2.1.4.4. Actividad antimicrobiana de las BAL	13
2.1.5. Compuestos antimicrobianos producidos por las BAL	13
2.1.5.1. Ácidos orgánicos	13
2.1.5.2. Peróxido de hidrógeno y dióxido de carbono	16
2.1.5.3. Compuestos aromáticos	17
2.1.5.4. Ácidos grasos	18
2.1.5.5. Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular	18
2.1.5.6. Compuestos antimicrobianos de alto peso molecular	19
2.2. Microorganismos presentes en los alimentos	21
2.2.1. Microorganismos deterioradores	22
2.2.2. Microorganismos patógenos	22
2.3. Microorganismos de importancia para la salud pública	26
2.3.1. <i>Vibrio cholerae</i>	26
2.3.2. <i>Shigella</i>	27
2.3.3. <i>Escherichia coli</i>	28
2.3.4. <i>Salmonella</i>	29
2.3.5. <i>Staphylococcus</i>	33

2.3.6. <i>Listeria</i>	36
2.3.7. <i>Klebsiella, Citrobacter, Proteus</i>	38
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	41
<b>4. OBJETIVOS</b>	42
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	43
5.1. Cepas empleadas	43
5.2. Medios de cultivo	43
5.3. Pureza de las BAL	45
5.4. Pruebas de la actividad inhibitoria	48
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	51
6.1. Pureza de las BAL	51
6.2. Prueba de actividad inhibitoria	53
<b>7. CONCLUSIONES</b>	71
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	72

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1.	Bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas	7
2.	Alteraciones de los alimentos por BAL	14
3.	Clasificación de las bacteriocinas según Jack y col.	20
4.	Alteraciones en los alimentos causadas por diferentes microorganismos	23
5.	Principales enfermedades transmitidas por los alimentos en los Estados Unidos	25
6.	Características de las cepas <i>E. coli</i> según su patogenicidad.	30
7.	Reportes identificados de brotes causados por <i>Salmonella</i> en varios países	32
8.	Personas afectas por brotes de <i>Staphylococcus</i> según alimento y factor propiciador	35
9.	Casos de listeriosis con vehículo identificado en diferentes países	37
10.	Relación de cepas para el ensayo de actividad antimicrobiana por la técnica de la doble capa.	44
11.	Origen de las cepas de BAL aisladas de diferentes productos lácteos elaborados artesanalmente adquiridos en el Estado de Hidalgo	46
12.	Concentración de antibiótico utilizado para la prueba de actividad antimicrobiana	50
13.	Resultados de inhibición de BAL frente a microorganismos patógenos y/o deterioradores mediante la técnica de la doble capa	55
14.	Número de microorganismos inhibidos por las cepas de BAL mediante la técnica de la doble capa	59

15.	Cepas con actividad inhibitoria aisladas de productos lácteos elaborados artesanalmente adquiridos en el Estado de Hidalgo	61
16.	Inhibición de microorganismos patógenos y/o deterioradores por cepas de BAL mediante la técnica de la doble capa	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1.	Principales vías del metabolismo de los carbohidratos	6
2.	Procedimiento para verificar la pureza de las BAL	47
3.	Procedimiento para pruebas de actividad inhibitoria	49
4.	Crecimiento típico de BAL en medio de cultivo sólido (agar MRS)	52
5.	Actividad inhibitoria de las cepas 0603 y 0605 de BAL contra <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A en agar MRS modificado utilizando la técnica de la doble capa	64
6.	Actividad inhibitoria de las cepas 0201 y 0704 de BAL contra <i>Vibrio cholerae</i> no O1 en agar MRS modificado utilizando la técnica de la doble capa	66
7.	Actividad inhibitoria de la cepa 1206 de BAL contra <i>Proteus vulgaris</i> en agar MRS modificado utilizando la técnica de la doble capa	68

## 1. INTRODUCCIÓN

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, 2002)

En la industria alimenticia las BAL propician un acentuado ambiente hostil para el crecimiento y la supervivencia de las bacterias patógenas. Los efectos inhibitorios no sólo son el resultado de una acidificación del medio, también pueden ejercer diversos sistemas de inhibición microbiana por la producción de ácidos orgánicos, metabolitos del oxígeno, compuestos orgánicos, antibióticos y bacteriocinas. Las bacteriocinas producidas por BAL pueden considerarse como conservadores naturales en algunos alimentos, o bien, las cepas bacteriocinogénicas pueden emplearse como cultivos iniciadores. Estos compuestos las hacen capaces de inhibir una gran variedad de microorganismos contaminantes, patógenos y/o deterioradores como *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus* y *Listeria*, también hongos y levaduras (Piard y Desmazeud, 1992; Schillinger y col., 1996).

En este trabajo se estudió el efecto inhibitorio de cepas de BAL previamente aisladas de productos elaborados artesanalmente en el Estado de Hidalgo, contra

bacterias patógenas y/o microorganismos deterioradores de alimentos. Con ello, se logró la integración de un banco de cepas de BAL nativas de la región con actividad inhibitoria para una posterior caracterización de los compuestos antimicrobianos. Las BAL que presentaron actividad antimicrobiana pueden ser utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración de productos lácteos para disminuir la presencia de microorganismos patógenos y/o deterioradores en dichos productos.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Bacterias Ácido Lácticas**

El concepto de bacterias ácido lácticas (BAL) como un grupo de organismos desarrollados se remonta a 1989 cuando Weigmann las definió como bacterias que forman leche ácida a partir del azúcar de la leche. Las características del grupo se fueron delineando al tomarse en consideración nuevos atributos, como reacciones fermentativas de diversos carbohidratos y polialcoholes, capacidad para coagular la caseína y luego disolverla (peptonización), licuación de la gelatina, temperaturas óptimas de crecimiento (25°, 37° o 45°C) y viabilidad en cultivos de laboratorio (Fernández, 2000).

#### **2.1.1. Características generales**

Las BAL poseen características ecológicas y metabólicas de importancia económica y tecnológica en los alimentos. Su clasificación se basa en la morfología, la forma de fermentar la glucosa, desarrollo a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad de crecer a altas concentraciones de sal y tolerancia a la alcalinidad y acidez (Axelsson, 1993).

En 1920 Orla-Jensen elaboró una monografía en la que explica, que “las verdaderas bacterias del ácido láctico” constituyen un grupo natural de bacterias Gram positivas generalmente inmóviles, no esporuladas, las cuales poseen forma de cocos o bastoncillos. Son fermentadoras de 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). 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 (Jay, 1992; Stiles y Holzapfel, 1997).

Las BAL son anaerobias, aunque pueden ser aerotolerantes, aunque algunas especies, como las que se encuentran en el intestino de los animales, son anaerobias

estrictas. Incluso en presencia de O<sub>2</sub> no son capaces de llevar a cabo la fosforilación oxidativa lo que está muy relacionado con su incapacidad de sintetizar el núcleo hemo de las porfirinas. Son bacterias anaerobias facultativas o microaerófilas (soportan tensiones reducidas de oxígeno); capaces de fermentar tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Algunas captan oxígeno por mediación de las oxidasas de las flavoproteínas, oxidación que se utiliza para producir peróxido de hidrógeno y/o para oxidar de nuevo el NADH producido durante la deshidrogenación de los azúcares. Son catalasa y oxidasa negativa porque están desprovistas de citocromos, y generalmente son nitrato reductasa negativas (Larrent, 1994; Adams y Moss, 1998).

Las BAL son 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. Con respecto al pH de crecimiento, existen algunas que pueden desarrollarse desde pH 3.2 hasta 9.6, pero la mayoría crece entre 4.0 y 4.5. Otra característica de las BAL es que son débilmente proteolíticas y lipolíticas. La tolerancia a la sal (6.5% NaCl) puede ser utilizada para distinguir a los *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* (Santillán, 2004; Axelsson, 1993).

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).

A pesar de la utilidad que las BAL tienen en la industria, es difícil cultivarlas por la necesidad de una gran cantidad de requerimientos nutricionales. Se utilizan varios medios de cultivo (selectivos o diferenciales) para el aislamiento y recuento de estos microorganismos a partir de alimentos, entre los que se encuentran agar MRS (de Man-Rogosa-Sharpe); agar APN (Actidiona-polimixinanitrato); agar de Lee y el agar de Chalmers (Charles, 1998).

### **2.1.2. Metabolismo de los carbohidratos**

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, del que resultan otros productos finales como etanol, ácido acético y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Esencialmente, en las BAL el metabolismo de los carbohidratos puede ser clasificado como: homofermentativos, heterofermentativos y heterofermentativos facultativos. A diferencia del músculo animal, las BAL pueden formar ácido láctico D(-) o L(+) o una mezcla racémica de los dos isómeros (Figura 1) (Holzapfel y Wood, 1995; 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 (Cuadro 1) se encuentran los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* (Casp y Requena, 1999; Jay 1992).

Las bacterias heterofermentativas no tienen fructosa-difosfato-aldolasa pero tienen fosfocetolasa 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 (CO<sub>2</sub>), 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 algunos del género *Lactobacillus*. Las bacterias heterolácticas son más importantes que las homolácticas desde el punto de vista de la producción de

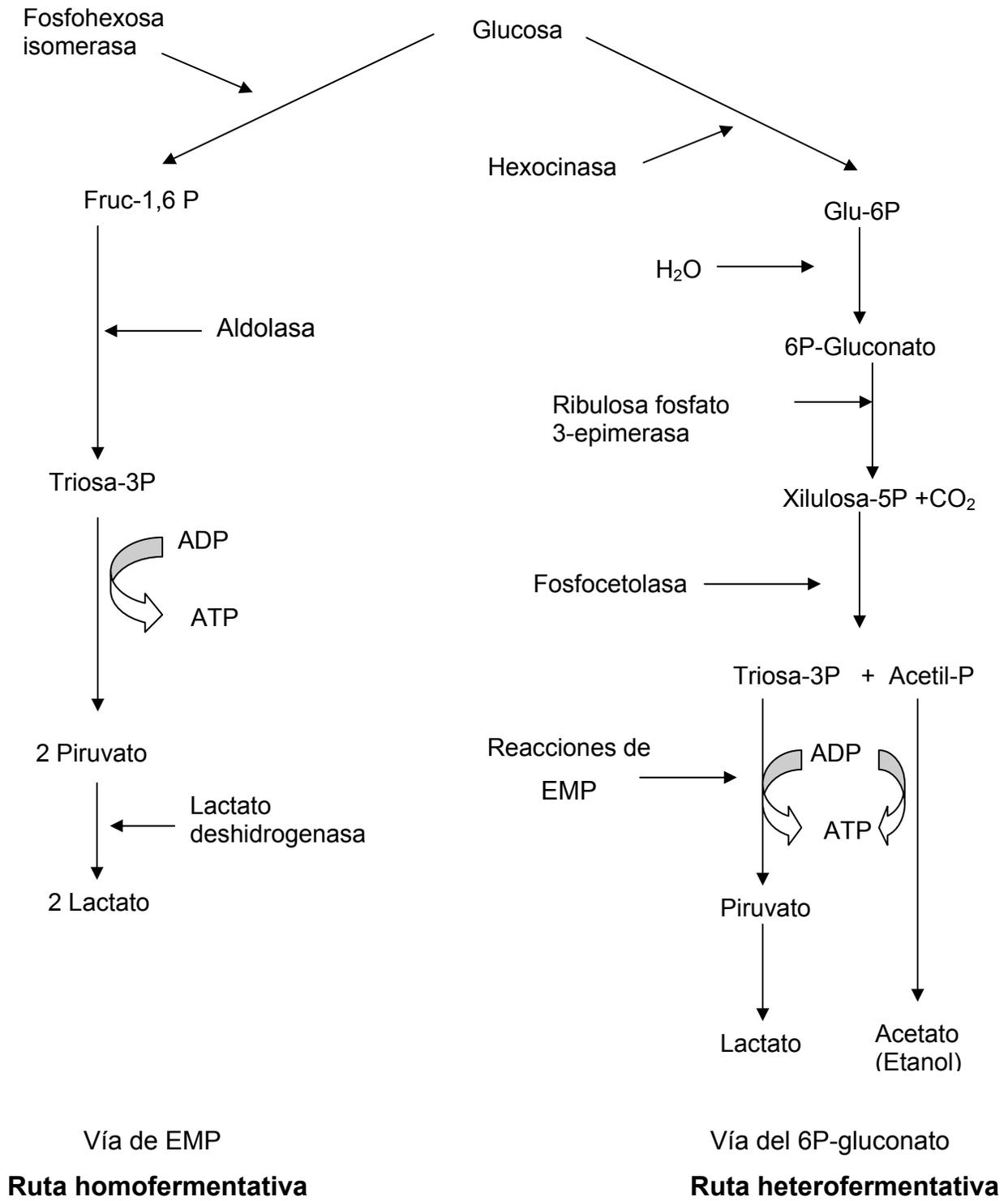


Figura 1. Principales vías del metabolismo de los carbohidratos (Adaptada de Axelsson, 1993).

**Cuadro 1.** Bacterias Ácido Lácticas Homofermentativas y Heterofermentativas  
(Adaptada de Stiles y Holzapfel, 1997).

Homofermentativas	Heterofermentativas	Heterofermentativas facultativas
<i>Lactobacillus:</i> <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>	<i>Lactobacillus:</i> <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>	<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>
<i>Pediococcus:</i> <i>P. damnosus</i> <i>P. dextranicum</i> <i>P. parvulus</i>	<i>Leuconostoc:</i> <i>Lc. amelibiosum</i> <i>Lc. argentinum</i> <i>Lc. lactis</i> <i>Lc. mesenteroides</i> <i>Lc. gelidum</i>	<i>Pediococcus:</i> <i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>P. damnosus</i> <i>P. dextranicus</i> <i>P. inopinatus</i>
<i>Streptococcus:</i> <i>S. bovis</i> <i>S. thermophilus</i>	<i>Carnobacterium:</i> <i>C. divergens</i> <i>C. mobile</i> <i>C. gallinarum</i> <i>C. piscicola</i>	
<i>Lactococcus:</i> <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>	<i>Weissella:</i> <i>W. confusus</i> <i>W. paramesenteroides</i> <i>W. confusus</i> <i>W. halotolerans</i> <i>W. minor</i> <i>W. viridescens</i>	
<i>Vagococcus:</i> <i>V. fluvialis</i> <i>V. salmoninarum</i>		

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 fosfatos para dar como productos en su mayoría ácido láctico, ácido acético, CO<sub>2</sub>, ácido fórmico y etanol. Las bacterias heterofermentativas 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 6P-gluconato (Lyhs, 2002; Vandamme y col., 1996).

### **2.1.3. Géneros de las BAL**

Al tratarse de un grupo heterogéneo, las bacterias lácticas están representadas por varios géneros de importancia: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Lactosphaera*, *Oenococcus* y *Tetragenococcus* los cuales tienen células en forma de cocos y el género *Lactobacillus*, con células en forma de bacilos. A estos géneros se han añadido recientemente algunos *Lactobacillus* heterofermentativos no acidodúricos que han sido reclasificados e incluidos en el nuevo género *Carnobacterium* (Adams y Moss, 1998; Stiles y Holzapfel, 1997).

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

El 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 puesto que su fermentación es de tipo homoláctico, 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 piridimícas. 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 *S. lactis* y *S. cremoris*, los cuales son responsables de la acidificación de la leche, y el *S. diacetylactis* que produce también la fermentación del ácido cítrico a diacetilo, sustancia característica del aroma de la mantequilla. Es también importante el *S. 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).

El género ***Leuconostoc*** se aísla de productos lácteos y cárnicos, vinos, frutas, hortalizas (en particular la remolacha), vegetales en fermentación, productos de panificación y de soluciones viscosas de azúcar. Son cocos en pares o en cadenas como los *Streptococcus* pero esta bacteria es heterofermentativa. Produce ácido láctico levógiro D(+), etanol y CO<sub>2</sub>. Estas especies son mesófilas (óptimo: 20-30°C) y se caracterizan por la producción de ácido a partir del citrato de la leche, algunas bacterias pueden fermentar la crema con producción de diacetilo (*Leuconostoc citrovorum*) y a veces por la síntesis de dextranos y de levanos extracelulares en presencia de sacarosa. Se encuentra involucrado en el deterioro de alimentos ricos en carbohidratos simples, pero utilizados en forma controlada, se usan en la elaboración de algunos quesos debido a la generación de aromas apreciables (Jay, 1992; Stiles y Holzapfel, 1997).

El género ***Lactobacillus*** comprende bacterias Gram positivas, en forma de bastoncillos, esporógenas, catalasa negativa, aerotolerantes o anaerobios, acidófilos, con requerimientos nutricionales muy complejos, vitaminas, aminoácidos. Incluye especies homofermentativas obligadas las cuales se dividen en termófilos y mesófilos, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas. Producen mayor cantidad de ácido láctico que los *Streptococcus* y tienen una intensa actividad proteolítica, la cual se aprovecha en la maduración de los quesos. En los de pasta cocida son importantes las especies termófilas como *Lb. helveticus* y el *Lb. lactis* y

para los quesos de pasta dura no cocida se utilizan las especies mesófilas como *Lb. casei* y *Lb. plantarum* (Casp y Requena, 1999; Leveau y Bouix, 2000).

El género ***Carnobacterium*** se desprendió del *Lactobacillus* cuando se observaron diferencias significativas de cepas aisladas de carne de vacuno, de pescado y de aves envasadas al vacío y almacenadas a baja temperatura. Son bacilos de 0.5-0.7 x 1.1-3.0 µm; en cultivos viejos se alargan. Son psicrótrofos con metabolismo homofermentativo y menos rigurosos en sus demandas nutricionales y de intolerancia al oxígeno. Originalmente se distinguen seis especies en el género: *C. alterfunditum*, *C. funditum*, *C. mobile*, *C. divergens*, *C. gallinarum* y *C. piscicola*. Dos caracteres que distinguen este género del género *Lactobacillus* es la ausencia de crecimiento en acetato y la composición en ácidos grasos (Fernández, 2000; Jay, 1992).

Las diferentes especies del género ***Pediococcus*** están en los vegetales en descomposición, a veces en las bebidas: cerveza, sidra y vino. Son cocos esféricos, 1.0-2.0 µm, anaerobio facultativo; cepas inhibidas en presencia de oxígeno. Los *Pediococcus* están formados por células agrupadas en pares. Son homofermentativos que fermentan los azúcares produciendo ácido láctico DL o L(+). Sus exigencias nutricionales, su débil actividad proteolítica y en la mayor parte de las especies su incapacidad para utilizar la lactosa, no les permite acidificar y coagular la leche. Las especies se diferencian por su tolerancia a la temperatura, al pH y al NaCl (Charles, 1998).

El género ***Lactococcus*** es utilizado como cultivo iniciador en la obtención de productos lácteos. Consiste en células ovoides Gram positivas que aparecen aisladas, en forma de pares o en cadenas, las cuales producen ácido L(+) láctico. Son homofermentativos y no forman esporas, tampoco tienen flagelos. Para su nutrición necesitan diversos aminoácidos y son también dependientes de diversas vitaminas. (Stiles y Holzapfel, 1997).

Son utilizados para la producción de lácteos. Dentro de las especies de *L. lactis*, dos subespecies, *lactis* y *cremoris* son las más ampliamente encontradas en las fermentaciones de productos lácteos. Los *Lactococcus* tienen influencia en la calidad sensorial del queso durante su manufactura y maduración (Sánchez, 2003).

Las bacterias del género ***Enterococcus*** consisten en células esféricas en forma de cocos Gram positivas dispuestas en pares o cadenas cortas, y son catalasa negativa. Son organismos que crecen entre 10-45°C, en 6.5% de NaCl y un pH de 9.6. Puede sobrevivir a temperaturas de 60°C por 30 min. Son muy comunes en quesos, se detecta en más del 96% de diferentes variedades de quesos italianos. En muchos quesos se utilizan como cultivos iniciadores y las células que sobreviven a la pasteurización se muestran activas y participan en la generación de aromas (Fernández, 2000; Stiles y Holzapfel, 1997).

#### **2.1.4. Importancia de las BAL**

##### **2.1.4.1. Cultivos iniciadores**

Un cultivo iniciador 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, (Jay, 1992; Madrid, 1999).

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 (Amiot, 1991; Early, 2000).

#### **2.1.4.2. Probióticos**

Los 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., 2002).

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., 2002).

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*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. casei* subesp. *rhamnosus*, *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *L. lactis* spp. *cremoris*, *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*, *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* (González y col., 2003; Soomro y col., 2002)

#### **2.1.4.3. 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 (Cuadro 2) (Fernández, 2000).

#### **2.1.4.4. Actividad antimicrobiana de las BAL**

El efecto antimicrobiano de las BAL contra otras bacterias se conoce desde hace muchos años. Metchnikof señalaba que una flora nativa intestinal estable regula la toxemia crónica natural que tiene un papel primordial en el envejecimiento y muerte. Aparte de la competencia por sustratos, los sitios de colonización y los productos de la fermentación, resultan inhibitorios para muchos patógenos (Fernández, 2000).

La fermentación reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y produce diversas moléculas orgánicas de bajo peso molecular que pueden presentar actividad antimicrobiana, siendo las más comunes el ácido láctico, acético y propiónico. No obstante, también se conoce que las bacterias ácido lácticas producen otras sustancias antagónicas, como son el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), reuterina, dióxido del carbono (CO<sub>2</sub>), diacetilo (2,3-butanodiona), acetaldehído y compuestos de alto peso molecular como las bacteriocinas (Ouwehand, 1993).

#### **2.1.5. Compuestos antimicrobianos producidos por las BAL**

##### **2.1.5.1. Ácidos orgánicos**

Dentro de los ácidos orgánicos se encuentran el ácido láctico, ácido propiónico y el ácido acético. La fermentación por BAL se caracteriza por la acumulación de estos ácidos y por la disminución de pH del ambiente de crecimiento, contribuyendo a la inhibición de microorganismos. La actividad antimicrobiana se asocia a la disminución de pH, así como en la forma no disociada de las moléculas (Ouwehand, 1993).

**Cuadro 2.** Alteraciones de los alimentos por BAL (Tomado de Fernández, 2000).

<b>Alteración</b>	<b>Alimento</b>
Coagulación	Leche
Sobreacidificación	Leches fermentadas
Coloraciones	Quesos
Enverdecimiento	Salchichas
Agriado	Carne
Fermentación / gasificación	Verduras
Espesamiento	Almíbares
Sabores ofensivos	Mayonesa

Los niveles y tipos de ácidos orgánicos producidos durante el proceso de fermentación dependen de la especie de los organismos, composición del cultivo y de las condiciones de crecimiento (Yang, 2000).

El **ácido láctico** es producido por la vía homofermentativa de las BAL como el principal metabolito a través de la vía EMP, puede interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas. Sin embargo, por la vía heterofermentativa se produce en pequeñas cantidades junto con el ácido acético, etanol y dióxido de carbono. El grado de disociación del ácido láctico depende del pH, donde un bajo pH se encuentra en la forma no disociada, siendo tóxico para hongos, levaduras y varias bacterias. En la actividad antimicrobiana, los esteroisómeros del ácido láctico difieren, de forma que el ácido L-láctico es más inhibitorio que el isómero D-láctico (Ouwehand 1993; Yang, 2000).

El **ácido acético y propiónico** son producidos por las cepas de BAL por la vía heterofermentativa, pueden interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas. Estos compuestos antimicrobianos son más efectivos que el ácido láctico debido a los elevados valores de pKa (ácido láctico 3.08, ácido propiónico 4.87 y ácido acético 4.75), por lo tanto tienen un mayor rango de actividad antimicrobiana contra levaduras, mohos y bacterias (Yang, 2000)

El ácido acético es más efectivo contra el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y la germinación de *Bacillus cereus*, que el ácido láctico y ácido cítrico. El ácido acético tiene una actividad sinérgica con el ácido láctico; el pH del medio disminuye por la acción del ácido láctico, aumentando la toxicidad del ácido acético. Un ejemplo es la reducción del crecimiento de *Salmonella typhimurium*, cuando se utiliza la combinación de ambos ácidos (Ouwehand, 1993; Sánchez, 2003).

### **2.1.5.2. Peróxido de hidrógeno y dióxido de carbono**

El **peróxido de hidrógeno** ( $H_2O_2$ ) es producido en presencia de oxígeno por las BAL a través de la acción de flavoproteína oxidasa o NADH peroxidasa. Las fermentaciones con producción de ácido láctico son esencialmente reacciones anaeróbicas por lo que la formación de peróxido de hidrógeno será limitada por la cantidad de oxígeno disuelto en el sustrato al iniciarse la fermentación. Su efecto antimicrobiano se debe a la oxidación de los grupos sulfhidrilo causando la desnaturalización de enzimas, y de la peroxidación de las membranas lipídicas, aumentando la permeabilidad de la membrana. El  $H_2O_2$  puede ser un precursor para la producción de radicales libres como son el superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxilo ( $OH^-$ ) los cuales dañan el DNA (Adams y Moss, 1998; Yang, 2000).

Se ha reportado que el  $H_2O_2$  producido por *Lactobacillus* y *Lactococcus* es capaz de inhibir cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.* y varios microorganismos psicrótrofos en alimentos. En leche cruda el  $H_2O_2$  activa el sistema lactoperoxidasa, produciendo hipotiocianato ( $OSCN^-$ ), oxiácidos ( $O_2SCN^-$  y  $O_3SCN^-$ ) y productos intermediarios de oxidación que tienen un amplio espectro de inhibición contra bacterias Gram negativas y Gram positivas (Yang, 2000).

El **dióxido de carbono** ( $CO_2$ ) es producido principalmente por la vía heterofermentativa de las BAL. Aún se desconoce el mecanismo de acción antimicrobiana del  $CO_2$ , sin embargo, puede crear un ambiente anaerobio el cual inhibe las descarboxilaciones enzimáticas, y la acumulación de  $CO_2$  en la bicapa lipídica de la membrana causando una disfunción en la permeabilidad. A bajas concentraciones el  $CO_2$  puede estimular el crecimiento de algunos organismos mientras que a una alta concentración puede prevenir el crecimiento de microorganismos deterioradores de alimentos. El grado de inhibición por  $CO_2$  varía considerablemente entre los organismos. El  $CO_2$  a concentración del 10% puede disminuir las cuentas bacterianas totales hasta un 50% y a concentraciones de 20-50% tiene una fuerte actividad antifúngica (Ouweland, 1993; Yang, 2000).

### **2.1.5.3. Compuestos aromáticos**

El **diacetilo** fue identificado por Van Niel en 1929 como el componente que proporciona el aroma y sabor a la mantequilla. Es producido por cepas de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* así como otros microorganismos por la fermentación del citrato. El efecto antimicrobiano del diacetilo se conoce desde 1930, tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias Gram negativas impidiendo el uso de arginina y de ser bacteriostático para bacterias Gram positivas (Ouweland, 1993).

En 1930, Lemoige describió la actividad del diacetilo contra *Bacillus subtilis* y en el año de 1982 Jay observó que es más efectivo a un pH <7, también mostró que es más activo contra bacterias Gram negativas, mohos y levaduras que con bacterias Gram positivas. El diacetilo a 344 µg/mL puede inhibir cepas de *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Aeromonas*. Dado que la producción de diacetilo durante la fermentación láctica es baja y los niveles sensoriales aceptables son de 2-7 µg/mL, esto limita su uso como conservador en alimentos. Sin embargo, el diacetilo puede actuar sinérgicamente con otros factores antimicrobianos y contribuir a los sistemas combinados de conservación en los alimentos fermentados (Ouweland, 1993; Yang, 2000).

El **acetaldehído** es producido por cepas de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* mediante la acción de una treonina aldolasa, la cual transforma la treonina en acetaldehído y glicina. Debido a que el *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* presentes en el yoghurt no pueden metabolizar el acetaldehído, éste se acumula en el producto aumentando la concentración a 25 ppm. A una concentración entre 10-100 ppm el acetaldehído inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* en productos lácteos (Sánchez, 2003)

#### **2.1.5.4. Ácidos grasos**

Bajo ciertas condiciones, algunos *Lactococcus* y *Lactobacillus* los cuales poseen actividad lipolítica generan cantidades significativas de ácidos grasos, por ejemplo en leche fermentada. La actividad antimicrobiana de los ácidos grasos ha sido reconocida desde hace muchos años. Los ácidos grasos insaturados tienen actividad en contra de bacterias Gram positivas y en cuanto a su actividad antifúngica depende de la longitud de la cadena, la concentración y el pH del medio. La acción antimicrobiana de los ácidos grasos es debido a la molécula disociada y a los efectos del pH, siendo más rápida la inhibición a un pH bajo (Yang, 2000).

#### **2.1.5.5. Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular**

Hay diversos reportes sobre la producción de compuestos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana por BAL. Estos componentes comparten la característica de ser activos a pH bajo, son termoestables, tiene un espectro amplio de actividad y son solubles en acetona (Ouwehand, 1993).

La **reuterina** ( $\beta$ - hidroxipropanaldehído) es una sustancia antimicrobiana con peso molecular de 74 Da producida por cepas de *Lactobacillus reuteri*, las cuales se encuentran en la microflora del tracto gastrointestinal de humanos y muchos animales, tienen la característica de ser heterofermentativas y crecen anaerobicamente en una mezcla de glucosa y glicerol o gliceraldehído. La reuterina tiene un amplio espectro antimicrobiano contra bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, mohos, levaduras, protozoos y virus. Dentro de los organismos importantes en la salud pública que son sensibles a la reuterina se encuentran especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* y *Tripanosoma* (Ouwehand, 1993; Yang, 2000).

El **ácido piroglutámico** con peso molecular <1000 Da, es producido por *Lactobacillus casei* subesp *casei*, *Lactobacillus casei* subesp *pseudopantarum* y *Streptococcus bovis*. Es capaz de inhibir a bacterias como *Bacillus subtilis*, *Enterobacter colacae* y *Pseudomonas putida* (Ouwehand, 1993).

#### **2.1.5.6. Compuestos antimicrobianos de alto peso molecular**

Dentro de estos compuestos se encuentran las **bacteriocinas**, las cuales se definen como péptidos biológicamente activos que tienen propiedades inhibitoras contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora. El interés por las mismas deriva del hecho de que son producidas por organismos que se encuentran en los alimentos y por esta razón podrían ser consideradas como "naturales" y por lo tanto más admisibles que los conservadores químicos (Ouweland, 1993).

Las bacteriocinas pueden usarse en conservación de alimentos en su forma natural o como cultivos iniciadores que forman bacteriocinas en los alimentos. El uso potencial de estos productos y el de determinadas enzimas en conservación de alimentos se describe con el término «bioconservación». El uso de bacteriocinas cumple la demanda de ser sustancias naturales para conservar alimentos. Antes de usar bacteriocinas o cultivos bacterianos en alimentos, es necesario asegurarse que las bacterias no producen toxinas (Erich y Martín, 1995).

Las bacteriocinas difieren en su espectro de actividad, características bioquímicas y determinantes genéticos. La mayoría de las bacteriocinas son pequeñas generalmente de 3-10 kDa, tienen un punto isoeléctrico alto y contienen dominios hidrofóbicos e hidrofílicos. De acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas se han clasificado en tres principales clases de bacteriocinas, incluyendo lantibióticos, péptidos pequeños termoestables y proteínas grandes termolábiles. Además se ha propuesto una cuarta clase que consiste en bacteriocinas que forman grandes complejos (Cuadro 3) (Oscáriz y Pisabarro, 2001).

El modo de acción de las bacteriocinas es complejo. Los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que

**Cuadro 3.** Clasificación de las bacteriocinas según Jack y col. (Adaptada de Oscáriz y Pisabarro, 2001).

CLASE	SUBCLASE	CARACTERÍSTICAS	EJEMPLOS
<b>I: Lantibióticos</b> Contienen aminoácidos poco comunes como lantionina, metil-lantionina, dehidrobutirina y dehidroalanina	Ia	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Péptidos pequeños, catiónicos en forma de espiral</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nisina A y Z</li> <li>• Epidermina</li> </ul>
	Ib	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Péptidos aniónicos o neutros de forma globular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mesardicina</li> <li>• Mutacina A</li> <li>• Cinamicina</li> </ul>
<b>II: No lantibióticos</b> Son péptidos termoestables (110°-121°C) con masas moleculares de 10 kDa.  No contiene aminoácidos modificados.	<b>II a</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Péptidos activos contra <i>Listeria</i></li> <li>• Tienen la secuencia en la región N-terminal TGNGVXC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pediocina PA-1</li> <li>• Sakacina P</li> </ul>
	<b>II b</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requieren de dos péptidos diferente para una mejor actividad antimicrobiana</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lactococcina G</li> <li>• Plantaricinas EF y JK.</li> </ul>
	<b>II c</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se transportan mediante péptidos líder</li> <li>• Algunos son sec-dependientes</li> <li>• Pueden ser de dos tipos: Antibióticos sin cisteína y con 1 ó 2 residuos de cisteína</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Divergicina A</li> <li>• Acidocina B</li> <li>• Enterocina B</li> </ul>
<b>III Péptidos grandes termolábiles</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poseen una masa molecular mayor de 30 kDa</li> <li>• La mayoría son producidos por el genero <i>Lactobacillus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Helveticina J</li> <li>• Acidofilicina A</li> <li>• Lactacinas A y B</li> </ul>
<b>IV Bacteriocinas complejas</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Son proteínas con lípidos y/o carbohidratos para ser activos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lactocina 27</li> <li>• Pediocina SJ-1</li> </ul>

depende del potencial de membrana, el cual esta influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos generando la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza motriz de protones (FMP), salida de ATP y aminoácidos, ocasionando la inhibición de la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular (González y col., 2003).

## **2.2. Microorganismos presentes en los alimentos**

Los productos alimenticios contienen todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de microorganismos, sin embargo, la composición del alimento tiene un efecto selectivo sobre la flora microbiana. Los microorganismos se desarrollan en función de los parámetros físico-químicos del alimento y de las características de cada microorganismo (Moreno y col., 1983).

Inicialmente, existe una gran variedad de microorganismos en la superficie de los alimentos naturales y, en ocasiones, en su interior. La composición cualitativa y cuantitativa es determinada por numerosos factores. Excepto en productos que han recibido diversos tratamientos antimicrobianos severos (pasteurización) o alimentos que por su naturaleza no suelen ser contaminados. Algunos microorganismos presentes en los alimentos sobreviven, otros se multiplican y otros se inactivan (Fernández, 2000).

Los productos alimenticios, animales o vegetales, se encuentran a menudo protegidos del medio exterior por tegumentos, piel o concha, que constituyen una barrera a la penetración de los microorganismos durante la vida del animal o de la planta. Esta barrera antimicrobiana disminuye después del sacrificio o recolección de los alimentos por simple descomposición natural o por la eliminación de la barrera protectora (Mescle y Zucca, 1994).

### **2.2.1. Microorganismos deterioradores**

La descomposición de los alimentos es consecuencia de la actividad de los microorganismos que lo han contaminando, de la composición del alimento, del tiempo y de las condiciones en las que son almacenados. La acción microbiana predominante sobre las proteínas, lípidos o carbohidratos provoca cambios distintos, aun tratándose del mismo alimento (Fernández, 2000).

Muchos bacilos Gram negativos con capacidad psicrótrofa poseen un gran potencial deteriorativo. Actúan en alimentos como las carnes rojas y el pollo, el signo de descomposición es el mal olor, enranciamiento y aparición de olores, por ejemplo, en la carne refrigerada ocasiona la formación de mohos en la superficie, mientras que en la carne curada adquiere un sabor ácido por el crecimiento de *Micrococcus* y *Lactobacillus*. Los jugos de frutas se deterioran como resultado de procesos fermentativos a cargo de levaduras, y los vegetales por la invasión de bacterias Gram negativas (Fernández, 2000; Frazier y Westhoff, 2000). En el cuadro 4 se presentan algunas alteraciones en los alimentos ocasionadas por los microorganismos.

Debido a las condiciones del medio, solamente una pequeña cantidad de los diferentes microorganismos existentes será capaz de multiplicarse rápidamente y producir alteraciones en el alimento. El tipo de la alteración del alimento dependerá del tipo y número de los agentes microbianos que existan en el medio que los rodea. Si se permite que se continúe la alteración producida por los primeros microorganismos, es probable que una o más especies de otros microorganismos produzcan alteraciones secundarias, o que en la alteración intervengan una serie de microorganismos que produzcan una serie de modificaciones en el alimento (Frazier y Westhoff, 2000).

### **2.2.2. Microorganismos patógenos**

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

**Cuadro 4.** Alteraciones en los alimentos causadas por diferentes microorganismos  
(Adaptada de Frazier y Westhoff, 2000).

<b>Alimento</b>	<b>Bacteria</b>	<b>Alteración</b>
Leche	<i>Serratia</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Flavobacterium</i>	Coloración azul, rojo, amarillenta en el producto
Queso Mozzarella	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Formación de gas
Carne de ave	<i>Proteus</i> <i>Aeromonas</i>	Putrefacción con formación de color negro
Duraznos enlatados	<i>Rhizopus</i>	Daña la textura del durazno
Leche	BAL, <i>Micrococcus</i>	Coagulación de la leche y leche filante
Carne	<i>Pseudomonas</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Micobacterium</i>	Mucosidad, agriado, pegajosidad y putrefacción
Carne curada	<i>Bacillus</i>	Formación de gas en la lata
Jitomates	<i>Alternaria alternata</i>	Podredumbre blanca y negra

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 perfringes*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholera*. (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). El cuadro 5 muestra las principales enfermedades de origen bacteriano transmitidas por los alimentos en Estados Unidos

**Cuadro 5.** Principales enfermedades transmitidas por los alimentos en los Estados Unidos (Tomado del Scientific Status Summary, 2004).

Bacteria	Principales síntomas	Fuente de contaminación	Número de casos	Numero de muertes
<i>Bacillus cereus</i>	Diarrea acuosa, dolor abdominal, náuseas	Productos cárnicos, leche, vegetales, pescado y pan	27,360	0
<i>Campylobacter spp.</i>	Diarrea acuosa, fiebre, dolor de cabeza, náuseas y dolor abdominal	Pollo crudo, leche cruda, carne de cerdo y vaca, pescado	1,963,141	99
<i>Listeria monocytogenes</i>	Náuseas, vómitos, diarrea	Leche, carnes y vegetales crudos, quesos, pescado ahumado y crudo	2,493	499
<i>Salmonella ssp.</i>	Fiebre, dolor de cabeza y abdominal	Carnes crudas, leche y productos lácteos, huevos, pescado, ensaladas	1,341,873	553
<i>Shigella ssp.</i>	Dolor abdominal, diarrea, fiebre, vómitos	Ensaladas, macarrones, pollo, vegetales crudos, leche y productos lácteos, sandwich	89,648	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nauseas, vómitos, dolor abdominal	Carne y productos cárnicos, huevos, ensaladas (papa, pollo), leche y productos lácteos	185,060	2
<i>Vibrio cholerae</i> O1	Diarrea acuosa, nauseas, vómitos	Mariscos, pescado	49	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Fiebre, diarrea, vómitos, dolor abdominal	Carnes, ostiones, leche cruda, pescado	86,731	2

## **2.3. Microorganismos de importancia para la salud pública**

### **2.3.1. *Vibrio cholerae***

Las bacterias de la familia *Vibrionaceae* consisten en bacilos cortos Gram negativos pleomórficos (curvados o rectos) que son móviles con flagelos polares envainados, no esporulados. Las células son catalasa y oxidasa positivas, termolábiles y anaerobias facultativas con metabolismo tanto fermentativo como respiratorio. Son muy sensibles al pH bajo y toleran un medio alcalino (pH mayor de 9). Tienen un temperatura de crecimiento entre 10° - 43°C con una temperatura óptima de 37°C (Fernández, 2000).

El género *Vibrio* contiene más de 34 especies, 12 son patógenas para el hombre y, de éstas, 10 se consideran halófilas. Las especies halófilas requieren para su crecimiento una concentración de NaCl no inferior al 1%, aunque su crecimiento óptimo es de 2-3%. Sin embargo una concentración de 0,5% puede permitir el aislamiento de las mismas (Frazier y Westhoff, 2000).

Existen dos variedades de *V. cholerae* que son potencialmente patógenas para los humanos. El principal tipo que causa el cólera es *V. cholerae* O1, y los otros tipos son conocidos como no O1. El *V. cholerae* O1 u O139 son los responsables de la epidemia asiática o cólera. Por otro lado, el *V. cholerae* no O1 causa una enfermedad menos severa que el cólera ([www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov), 2005).

El hábitat natural de la bacteria es el medio acuático. De ahí se esparce al medio ambiente, especialmente a las aguas residuales que se contaminan directamente con la materia fecal, o a través de descargas de aguas negras. Se multiplica en el alimento sin ocasionar su deterioro (Adams y Moss, 1998)

El cólera es considerado como infección transmitida por alimentos, agua contaminada o por mariscos. Esta infección es causada por la bacteria *V. cholerae* O1 ó O139, provoca diarrea severa en los seres humanos por el consumo de alimentos contaminados, aunque con frecuencia el alimento que ha estado en contacto con agua contaminada puede constituir el vehículo de infección. En los brotes de cólera los

alimentos implicados son frutas y hortalizas que han sido lavadas con agua contaminada y que se consumen sin cocción. También los alimentos que proceden del hábitat natural, por ejemplo los alimentos de origen marino y ancas de rana pueden ser vehículos de la bacteria (Mescle y Zucca, 1994).

Las principales causas de la enfermedad son la higiene deficiente, el agua contaminada y el manejo inadecuado de los alimentos. Para prevenir las infecciones causadas por *V. cholerae*, el agua se debe hervir así como un manejo higiénico de los alimentos ([www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov), 2005).

### **2.3.2. *Shigella***

Las bacterias del género *Shigella* son bacilos Gram negativos, inmóviles, anaerobios facultativos, no esporulados, poco descatados como fermentativos pero anaerogénicos. No fermentan la lactosa, son oxidasa negativa y catalasa positiva, con excepción de un serovar de *S. dysenteriae*. Reaccionan negativamente a la pruebas de ureasa y gelatinasa. Son organismos mesófilos cuya temperatura varía entre 10-45°C, crecen a valores de pH de 6 a 8 y no sobreviven a valor de pH inferior a 4.5. Se multiplican en el alimento sin causar su deterioro. No colonizan especies animales (excepto primates), la enfermedad ocurre en seres humanos ocasionando disentería bacilar (Adams y Moss, 1998).

El género *Shigella* esta integrado por cuatro especies *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*, todas son consideradas patógenas para el hombre si bien se diferencia en cuanto a la gravedad de la enfermedad que causa una de ellas. *S. sonnei* causa la enfermedad más benigna, mientras que la causada por *S. flexneri* y *S. boydii* es de gravedad intermedia. En el caso de *S. dysenteriae* ha sido responsable de epidemias de disentería bacilar grave en países tropicales (Adams y Moss, 1998).

El organismo con frecuencia se encuentra en agua contaminada con materia fecal y en alimentos que han recibido un manejo antihigiénico. También está asociada

con vehículos crudos como ensaladas (papa, atún, camarón, macarrones, y pollo), productos avícolas, leche y productos lácteos. La contaminación de estos alimentos ocurre generalmente a través de la ruta fecal-oral ([www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov), 2005).

El 20% de casos reportados de shigellosis esta relacionado con los alimentos como vehículos de transmisión. También es común observar un portador humano del microorganismo que sigue prácticas antihigiénicas y condiciones de abuso de la temperatura que propicia la multiplicación de *Shigella*, por ejemplo el cóctel de camarón o la preparación de ensalada de papa en la que se acostumbra pelarla manualmente. En zonas en las que la eliminación de aguas residuales no es adecuada el organismo podría ser transmitido a partir de las heces por medio de las moscas. Los principales alimentos involucrados incluyen ensaladas y mariscos contaminados durante su manipulación por los trabajadores (Scientific Status Summary, 2004).

La *Shigella* es sensible al calor y muere por calentamiento (mayor a los 70°C), por lo tanto, una cocción adecuada y la higiene en el manejo de los alimentos puede prevenir las infecciones causadas por *Shigella* en gran medida ([www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov), 2005).

### **2.3.3. *Escherichia coli***

Las especies del género *Escherichia* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos, no esporulados, catalasa positivos y oxidasa negativos, son móviles por flagelos peritricos, fermentan la lactosa y glucosa. 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).

Esta bacteria es un habitante del intestino de las personas y de los animales de sangre caliente donde es anaerobio facultativo predominante. Debido a que se encuentra taxonomicamente bien definida su hallazgo en el alimento o en el agua es más significativo desde el punto de vista sanitario, que el de cualquier otro coliforme.

La mayoría de las cepas no son patógenas, sin embargo, algunas causan infecciones en el hombre que pueden localizarse en el tracto intestinal o fuera de él (Frazier y Westhoff, 2000).

Actualmente se reconocen seis grupos de *E. coli* productoras de diarrea basadas en sus propiedades de virulencia que dan lugar a diversos padecimientos: enteropatógena (ECEP), enterotoxigénica (ECET), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica (ECEH), enteroadherente (ECEA) y enteroagregativa (ECEG). En el cuadro 6 muestra algunas características de los grupos de *E. coli* (Fernández, 2000).

Su presencia en alimentos, por ejemplo en verduras, es sugestiva de contaminación fecal reciente, considerando que el microorganismo no suele existir en estos productos y que probablemente se multiplica o tiende a morir. 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).

Dentro de los alimentos que se encuentran asociados con esta bacteria se encuentra a las hamburguesas poco cocinadas o crudas (carne picada) las cuales han estado implicadas en brotes por *E. coli* O157:H7. También se han encontrado brotes causados por el consumo de germinado de alfalfa, jugos de frutas ultrapasteurizados, salami seco-curado, lechuga, carne de bovino y cuajadas de queso. La leche cruda fue el vehículo en un brote ocurrido en una escuela en Canadá ([www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov), 2005).

#### **2.3.4. *Salmonella***

La salmonelosis es consecuencia de la ingestión de células viables pertenecientes al género de *Salmonella*. Se trata de una infección de origen bacteriano

**Cuadro 6.** Características de las cepas *E. coli* según su patogenicidad (Adaptada de [www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov), 2005).

<b>Cepa <i>E. coli</i></b>	<b>Toxinas</b>	<b>Síntomas</b>
<b>Enterotoxigénica</b> El padecimiento es común en países subdesarrollados	Produce dos enterotoxinas: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Termolábil</li> <li>▪ Termoestable</li> </ul>	Diarreas acuosas Diarrea del viajero
<b>Enteropatógena</b>	Produce una enterotoxina citotóxica similar a la de <i>Shigella dysenteriae</i>	Diarrea acuosa Diarreas entre lactantes
<b>Enterohemorrágica</b> <i>E. coli</i> O157:H7	Produce una enterotoxina citotóxica Vero (verotoxina)	Diarrea con sangre Colitis hemorrágica Síndrome urémico-hemolítico (SUH) Muerte
<b>Enteroinvasiva</b> Es inmóvil y no fermenta la lactosa	Aún se desconoce la formación de enterotoxinas	Diarreas con sangre Fiebre y tenesmo
<b>Enteroadherente</b>	No hay formación de enterotoxinas, pero se adhiere por fimbrias	Diarrea acuosa
<b>Enteroagregativa</b>	No forma enterotoxinas. Se adhiere mediante fimbrias	Diarrea acuosa con moco, y eventualmente sangre

transmitida por los alimentos y el agua que han sido expuestos al microorganismos por una contaminación cruzada o directa (Adams y Moss, 1998).

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, consiste en bacilos Gram negativos que fermentan la glucosa, generalmente con producción de gas, pero normalmente no fermentan la lactosa ni la sacarosa. Son organismos no esporulados, aerobios o facultativos anaerobios, catalasa positiva, oxidasa negativa y son móviles por flagelos peritricos. Tienen una temperatura de crecimiento de 5°C hasta 47°C con un crecimiento óptimo de 37°C. Las especies del género *Salmonella* son resistentes a la congelación y la deshidratación pero son termosensibles y se destruyen fácilmente por temperaturas de pasteurización (Frazier y Westhoff, 2000).

La *Salmonella* es una bacteria que ocasiona infección intestinal en los animales, incluido el hombre. Se libera al ambiente cuando se expulsa por las heces. Otras fuentes de aislamiento son el agua, suelo, insectos, carnes crudas, huevos, leche y productos lácteos, pescados y mariscos crudos como camarón (Adams y Moss, 1998).

Los alimentos como vehículo de *Salmonella* tienen importancia especial en los brotes de salmonelosis humana. Los alimentos en los que pueden proliferar el microorganismo son carnes crudas, productos avícolas, huevos, leche y productos lácteos, mezclas para tortas, postres rellenos con cremas, salsas y ensaladas preparadas, postres, mantequilla de maní ([www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov), 2005).

En general los alimentos identificados como responsables en los brotes de salmonelosis incluyen productos crudos como leche, carne, frutas y verduras, productos cocinados en cualquier forma y sitio, y los procesados en fábricas (Scientific Status Summary, 2004). El cuadro 7 muestra algunos alimentos asociados con brotes de salmonelosis en varios países.

**Cuadro 7.** Reportes identificados de brotes causados por *Salmonella* en varios países  
(Adaptado de Blackburn y McClure, 2002).

<b>Año</b>	<b>País</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Casos</b>
1990	USA	Melón	295
1990	USA	Jitomate fresco	176
1991	USA	Melón	>400
1993	USA	Jitomate	100
1994	Finlandia	Germinado	210
1995	USA y Finlandia	Germinado de alfalfa	242
1995	USA y Canadá	Germinado de alfalfa	133
1997	USA	Melón	>20
2000	USA	Melón	>19
2000	USA	Germinado	45
2001	USA	Germinado de alfalfa	32

En los Estados Unidos se registró un brote importante de *Salmonella* asociado al consumo de carne de vaca. El brote se reportó en febrero de 1995, el Departamento de Salud de Nuevo México (NMDOH), fue notificado por la presencia de *Salmonella* en dos personas que habían consumido carne de vaca. Una investigación por el NMDOH, determinó que estos casos se relacionaban en una planta local donde se procesaba la carne de vaca. El 24 de enero, los hombres habían comprado y consumido carne seca de vaca, presentando días después diarrea y calambres abdominales. La cepa de *Salmonella* Montevideo se aisló y se identificó de los cultivos de la carne de vaca y del equipo con el que se manipulo el alimento (Centers for Disease Control and Prevention, 1995).

La *Salmonella* es sensible al calor y muere por calentamiento (mayor a los 70 °C). Los alimentos crudos o que hayan sufrido una media cocción, además de la contaminación cruzada que ocurre cuando los productos cocidos entran en contacto con los materiales crudos o contaminados (como las tablas para cortar), son las principales causas de infección. Por lo tanto, la cocción adecuada y la higiene durante la manipulación de los alimentos puede prevenir en gran medida las infecciones causadas por *Salmonella* ([www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov), 2005).

### **2.3.5. *Staphylococcus***

Una de las intoxicaciones alimentarias que se presentan con mayor frecuencia es la originada por la ingestión de la enterotoxina que se forma en los alimentos cuando en ellos se multiplican ciertas cepas de *Staphylococcus aureus*. La toxina recibe la denominación de enterotoxina estafilocócica entérica la cual produce gastroenteritis o inflamación de la mucosa que reviste el tracto gastrointestinal (Prescott y col., 1999).

El género *Staphylococcus* se presenta en forma de racimos de uvas, en parejas o en formas de cadenas cortas. *S. aureus* es la especie más importante del género, consiste de células esféricas Gram positivas de 0.8 a 1.2  $\mu\text{m}$  de diámetro en forma de

cocos. Son organismos catalasa positiva, oxidasa negativa, aerobios facultativos no esporulados, no móviles. Son mesófilo con un intervalo de temperatura de crecimiento entre 7-48°C y una temperatura óptima de 35-40°C. Crece con facilidad en medios que contiene un 5-7.5% de NaCl (Adams y Moss, 1998).

Sobre medios sólidos crecen dando colonias que suelen ser de color dorado o amarillo, aunque es posible que algunas carezcan de pigmento. Se puede aislar de heces y, esporádicamente, del suelo, agua de mar y el agua dulce, la superficie de las plantas, el polvo y el aire, y en las personas se encuentra asociado al tracto nasal en el que se encuentra en el 20-50% de los individuos sanos (Frazier y Westhoff, 2000).

Entre los alimentos que frecuentemente se ven involucrados en la intoxicación alimentaria causada por *Staphylococcus* se encuentran la carne y productos cárnicos, productos avícolas, ensaladas (huevo, atún, pollo, papas y macarrones), productos de panadería como los pasteles rellenos con crema, las tartas cremosas y los chocolates, leche y los productos lácteos, rellenos para emparedados. Los alimentos que requieren de una considerable manipulación durante su preparación y son mantenidos a temperaturas ligeramente elevadas después de la misma, son aquellos involucrados en la intoxicación (Cuadro 8) (Scientific Status Summary, 2004).

La prevención total para evitar la contaminación del organismo no es posible, sin embargo los alimentos cocidos, calentados y almacenados adecuadamente son generalmente seguros. El mayor riesgo lo constituye la contaminación cruzada, que ocurre cuando los productos cocidos entran en contacto con los ingredientes crudos o contaminados. El almacenamiento inapropiado de los alimentos ocasiona el crecimiento de la bacteria y la producción de las toxinas. El posterior calentamiento puede no destruir la toxina ([www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov), 2005).

**Cuadro 8.** Personas afectas por brotes de *Staphylococcus* según alimento y factor propiciador (Adaptada de Fernández, 2000).

<b>Casos</b>	<b>Alimento</b>	<b>Lugar</b>	<b>Factor</b>
1364	Ensalada de pollo	Cocina central de escuelas	Enfriamiento inadecuado Portador
143	Jamón	Cocina anexa	Enfriamiento inadecuado en hospital
28	Jamón Piña	Supermercado	Conservación en caliente inadecuada Portador
800	Carne de cerdo	Día de campo	Preparado 3 días antes Refrigeración inadecuada Recalentamiento inadecuado Conservación en caliente inadecuada Portador
3	Jamón	Restaurante	Portador
6	Jamón	Hogar	Uso de sobrantes Conservación en caliente inadecuada
126	Ensalada de pollo	Iglesia	Preparado 2 días antes Enfriamiento inadecuado Portador
110	Puré de papas	Cocina central de guarderías	Contaminación cruzada (adición de tocino)
> 60	Pastel de moka	Pastelería	Portador Falta de refrigeración

### **2.3.6. *Listeria***

Las especies de *Listeria* son bacilos cortos Gram positivos no esporulados, de 1.2 x 0.5  $\mu\text{m}$ , a veces es cocoide y corineforme por mostrar diploformas dispuestas en "V"; las células también aparecen aisladas. Son anaerobios facultativos, móviles con flagelos peritricos. Presentan movilidad entre 20°-25°C pero no a 37°C. 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](http://www.cfsan.fda.gov), 2005).

La bacteria puede ocasionar una infección conocida como listeriosis, la cual ha sido el causante de problemas materno/fecales, septicémicos o neurológicos. 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 (Dromigny y col., 1994; Scientific Status Summary, 2004). En el cuadro 9 se muestran algunos brotes de listeriosis generados en varios países.

*L. monocytogenes* ha sido asociada con alimentos tales como la leche cruda, la leche líquida supuestamente (o erróneamente) pasteurizada, los quesos (en especial

**Cuadro 9.** Casos de listeriosis con vehículo identificado en diferentes países  
(Adaptado de Blackburn y McClure, 2002).

<b>Año</b>	<b>País</b>	<b>Casos (muertes)</b>	<b>Alimento implicado</b>
1980– 81	Canadá	41 (18)	Col fermentada
1983	USA	49 (14)	Leche pasteurizada
1985	USA	142 (48)	Queso panela
1992	Francia	279 (85)	Lengua de cerdo
1994	USA	45 (0)	Leche con chocolate
1995	Francia	20 (4)	Leche cruda y queso panela
1997	Italia	>1500 (0)	Ensalada de maíz
1998	USA	>50 (8)	Hot dogs y carne
1998	USA	40 (4)	Galletas y hot dogs
1998– 99	Finlandia	18 (4)	Mantequilla
1999– 2000	Francia	26 (7)	Lengua de cerdo

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. También influye la presencia de germen en materia fecal y partes externas de los animales propicia la contaminación de las partes comestibles (Adams y Moss, 1998).

En varios estados de los Estados Unidos se presentó un brote de infecciones originadas por *L. monocytogenes*, siendo 46 casos confirmados mediante cultivos siete muertes y tres abortos en ocho estados que consumieron carne de pavo. Los casos fueron reportados en Pennsylvania (14 casos), New York (11 en la ciudad de New York y 7 en otras localidades), New Jersey (5 casos), Delaware (4 casos), Maryland (2 casos), Connecticut (1 caso), Massachussets (1 caso), y Michigan (1 caso) (Centers for Disease Control and Prevention, 2002).

Probablemente, una prevención total no es posible; no obstante, los alimentos adecuadamente cocidos, calentados o almacenados son por lo general seguros, ya que la bacteria muere a una temperatura de 75°C. El mayor riesgo lo constituye la contaminación cruzada, que se da cuando los alimentos cocidos entran en contacto con las materias primas crudas o contaminadas ([www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov), 2005).

### **2.3.7. *Klebsiella, Citrobacter, Proteus***

Son bacterias entéricas pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae* y se denominan así porque con mucha frecuencia se encuentran en el tracto intestinal (entérico) de animales superiores. Son bacilos Gram negativos pequeños, anaerobios facultativos, son fermentadores de glucosa, oxidasa negativos, catalasa positivos y móviles con flagelos peritricos ([www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov), 2005).

Pueden ser recolectados de las heces de individuos saludables que no presentan síntomas de la enfermedad, a partir de los productos lácteos, los mariscos

crudos y los vegetales frescos y crudos. Los organismos están presentes en el suelo usado para la producción de cultivos y en las aguas de pesca de mariscos; como resultado éstos pueden constituir un peligro para la salud (Adams y Moss, 1998).

Son bacterias principalmente deterioradoras que participan en la descomposición de alimentos, generalmente en etapas avanzadas. En especial el género *Proteus* tiene un intenso efecto putrefactivo; por descarboxilación de aminoácidos que participa en la formación de aminas; común en la materia fecal y en la materia orgánica de descomposición. El queso Mozzarella muestra formación de gas asociada al desarrollo de *Klebsiella* (Fernández, 2000).

Las infecciones intestinales con estas especies en los Estados Unidos han tomado generalmente la forma de casos esporádicos. Por ejemplo *Citrobacter freundii* fue sospechoso de causar un brote diarreico en Washington, el alimento involucrado fue un queso Camembert importado. Los casos de la enfermedad clínica similares se han identificado posteriormente en cuatro estados (Colorado, Georgia, Illinois, y Wisconsin) asociados por el consumo de la misma marca de fábrica del queso Camembert (Centers for Disease Control and Prevention, 1983)

Además, los géneros *Klebsiella*, *Proteus* y *Citrobacter* también son microorganismos patógenos oportunistas responsables de una amplia gama de infecciones gastrointestinales y nosocomiales, causan actualmente 29% de infecciones en los Estados Unidos. Los sitios principales de las infecciones son en la zona urinaria, los sitios quirúrgicos, la circulación sanguínea y los pulmones (Frazier y Westhoff, 2000).

La enfermedad gastrointestinal aguda puede ocurrir más con frecuencia en las áreas subdesarrolladas del mundo. La enfermedad crónica es común en los niños subalimentados que viven en condiciones antihigiénicas en países tropicales ([www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov), 2005).

Las bacterias pertenecientes a estos géneros son sensibles al calor e inactivadas a través del calentamiento (superior a 70°C). Entre las mayores causas de infección se pueden mencionar a los alimentos crudos o los parcialmente cocidos y a la contaminación cruzada que ocurre cuando los alimentos preparados entran en contacto con los crudos o con superficies contaminadas (por ejemplo las tablas para picar). De este modo, la cocción apropiada e higiénica de los alimentos, puede prevenir ampliamente las infecciones gastrointestinales ([www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov), 2005).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La alteración de los alimentos propiciada por la actividad de los microorganismos, ocasiona un cambio en las características organolépticas, con degradación de algunos de los componentes acompañados de la formación de compuestos impropios del producto. Por este motivo, la investigación ha tratado nuevas propuestas para retardar el deterioro de los alimentos y evitar el desarrollo de estos microorganismos.

Las bacterias ácido lácticas además de ser los responsables de la fermentación de diversos alimentos, producen agentes antimicrobianos como son bacteriocinas, ácidos orgánicos, etanol, reuterina y otros metabolitos de importancia industrial, que pueden evitar el desarrollo de microorganismos deterioradores, así como lograr también la inhibición de microorganismos patógenos como es el caso de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*, los cuales son de gran importancia en la salud pública debido a los brotes de infecciones e intoxicaciones generados por el consumo de alimentos contaminados con estas bacterias.

La capacidad antibacteriana que presentan las BAL al evitar el desarrollo de microorganismos deterioradores y/o patógenos, ha motivado la investigación acerca de este tema para tratar de incrementar la calidad higiénica de los alimentos, así como para conservar los alimentos y mantener sus características sensoriales. En este trabajo se evaluó *in vitro* el efecto antibacteriano de cepas de BAL previamente aisladas de productos elaborados artesanalmente adquiridos en el Estado de Hidalgo, contra microorganismos patógenos y/o deterioradores de alimentos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

- ☞ Evaluar el efecto antagonista de compuestos antimicrobianos producidos por cepas de BAL contra microorganismos patógenos y/o deterioradores de alimentos *in vitro*.

### 4.2. Objetivos específicos

- ☞ Probar la actividad antimicrobiana de compuestos antimicrobianos de BAL frente a microorganismos patógenos.
- ☞ Probar la actividad antimicrobiana de compuestos antimicrobianos de BAL frente a microorganismos deterioradores de alimentos.
- ☞ Conformar un banco de cepas BAL con propiedades antimicrobianas para la posterior caracterización de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Cepas empleadas**

Se utilizaron cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos artesanales adquiridos en el Estado de Hidalgo a las cuales, se les determinó su actividad antimicrobiana. Se utilizaron también cepas de microorganismos patógenos y deterioradores de alimentos (Cuadro 10) proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Hidalgo y por el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

### **5.2. Medios de cultivo**

Los medios de cultivos utilizados durante la parte experimental son:

- Agar MRS (de Man-Rogosa-Sharpe, MERCK) para la purificación de las BAL
- Agar MRS Lactobacilli (DIFCO™) para la purificación de las BAL
- Caldo MRS (Man-Rogosa-Sharpe, MERCK)
- Caldo MRS Lactobacilli (DIFCO™)
- Agar de Soya Trypticaseína (BIOXON) para el crecimiento de bacterias patógenas
- Caldo de Soya Trypticaseína (BIOXON) para el crecimiento de microorganismos patógenos
- Agar de Soya Trypticaseína (BIOXON) modificado al 1% para la inoculación de microorganismos patógenos y/o deterioradores para la detección de la inhibición microbiana de las BAL
- Agar MRS modificado utilizado para la prueba de actividad de la cepa de BAL, con la siguiente composición:
  - Peptona de caseína (BIOXON).....10 gr.
  - Extracto de carne (BIOXON)..... 8 gr.
  - Extracto de levadura (BIOXON)..... 4 gr.

**Cuadro 10.** Relación de cepas para el ensayo de actividad antimicrobiana por la técnica de la doble capa.

Cepa
<i>Vibrio cholerae</i> No O1
<i>Vibrio cholerae</i> O1 Inaba
<i>Shigella sonnei</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A

- Acetato de sodio (J. T. BAKER)..... 5 gr.
  - Sulfato de magnesio (J. T. BAKER)..... 0.2 gr.
  - Sulfato manganoso (J. T. BAKER)..... 0.04 gr.
  - Tween 80..... 1 mL.
  - Agar bacteriológico (BIOXON)..... 14 gr.
- El caldo MRS modificado contiene la misma composición, excepto el agar bacteriológico.

### **5.3. Pureza de las BAL**

Inicialmente, se contaba con 332 cepas previamente aisladas de productos lácteos artesanales adquiridos en el Estado de Hidalgo, de las cuales solo 293 se identificaron como BAL y el resto como levaduras (Cuadro 11).

Para la verificar la pureza de las cepas de BAL se siguió el procedimiento señalado en la figura 2. Inicialmente, se inoculó la cepa de BAL (previamente descongelada) a un tubo con 5 mL de caldo MRS, y se incubó a 25°C por 24h (Incubadora Ríos Rocha S. A.), para el crecimiento de la cepa de BAL. Posteriormente se tomó una asada del cultivo para sembrar por estría en agar MRS. Las placas se incubaron 25°C por 48 h. Después del crecimiento de las colonias se observó la pureza de la cepa mediante tinción de Gram y pruebas de catalasa y oxidasa, además de considerar las características morfológicas típicas de las BAL, como la formación de colonias blancas puntiformes. También se tuvo cuidado que las colonias estuvieran lo suficientemente aisladas para permitir la selección de la colonia que se utilizó para realizar la prueba de inhibición.

**Cuadro 11.** Origen de las cepas de BAL aisladas de diferentes productos lácteos elaborados artesanalmente adquiridos en el Estado de Hidalgo.

Producto	Origen	Cepas de BAL	Levaduras
Queso Panela	- Mercado de Tulancingo - San Miguel Regla - Huejutla - Mercado de Actopan - Mercado de Singuilucan	45	5
Queso Oaxaca	- Mercado de Tulancingo - Mercado de Actopan - Tienda Richis, Tulancingo - Mercado de Tulancingo - Mercado de Actopan - Mercado de Tulancingo - En una tienda en Actopan - Mercado de Actopan - En una tienda en Singuilucan - Mercado en Tezontepec - En una tienda en Tezontepec - Jaltepec - Mercado de Tulancingo - Acatlán	132	8
Queso Canasto	- Mercado de Pachuca - Acatlán - Ciudad de México - Central de Abastos de Pachuca	30	10
Queso Doble Crema	- Mercado de Pachuca	12	0
Leche	- Mercado de Atotonilco	10	0
Queso Ranchero	- Pachuca	7	3
Queso Botanero	- Pachuca	7	3
Queso Manchego	- Pachuca - Jaltepec	17	3
Queso Cotija	- Tehuacan Puebla	5	5
Queso Molido	- Central de Abastos de Pachuca	9	1
Requesón	- Mercado de Tulancingo	9	1
Queso Blanco	- Central de abastos de Pachuca	10	0
<b>Total</b>		<b>293</b>	<b>39</b>

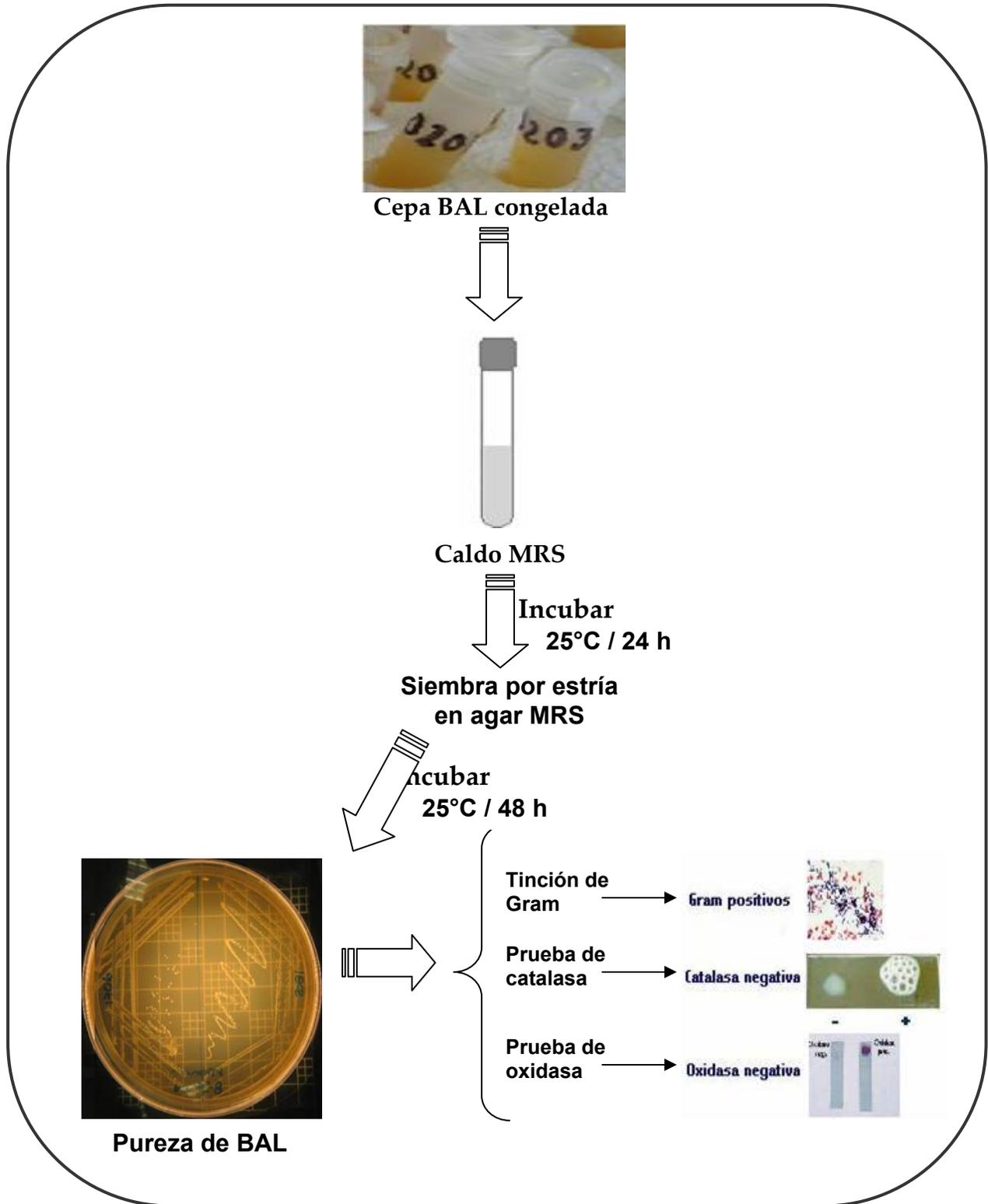
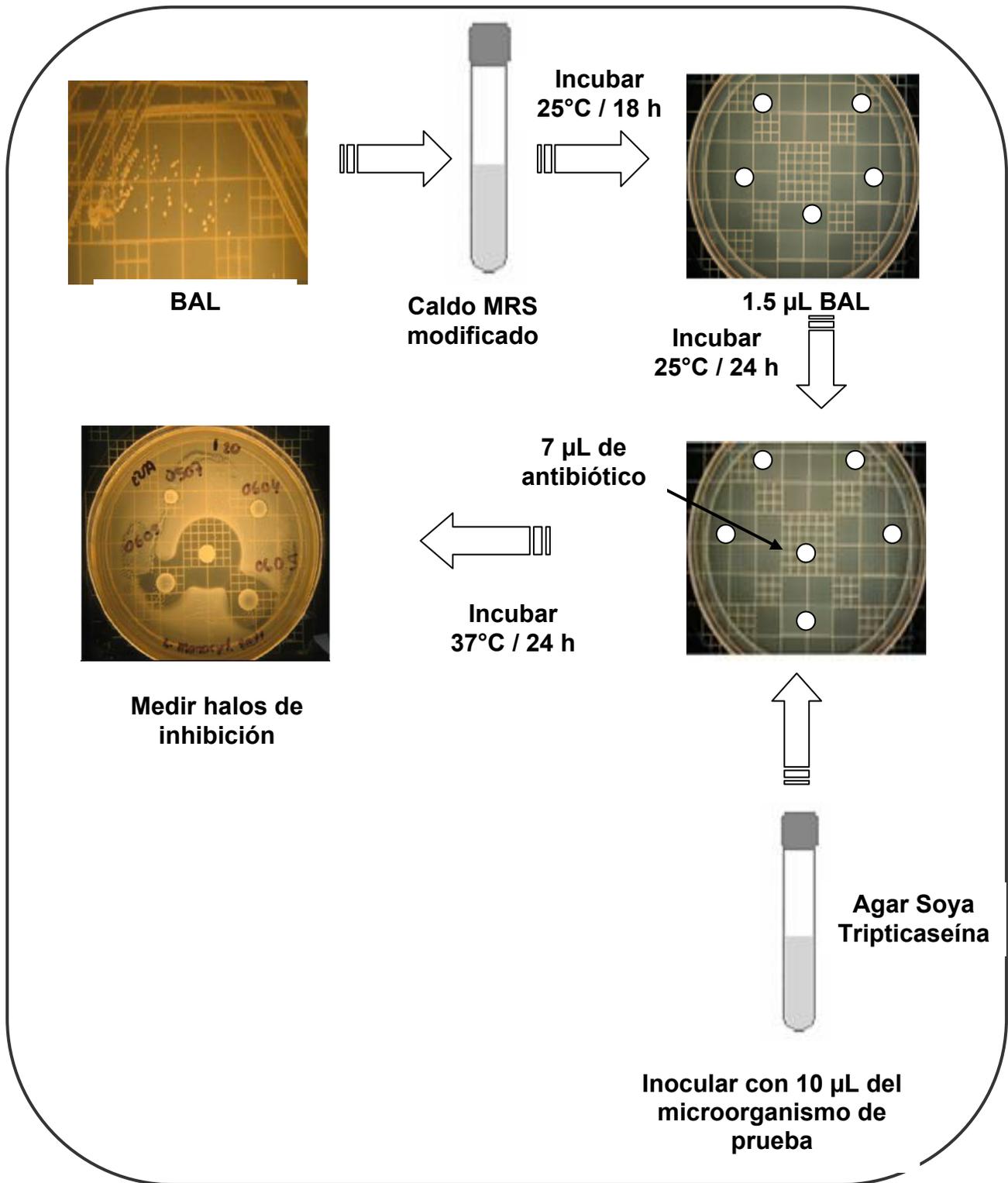


Figura 2. Procedimiento para verificar la pureza de las BAL

#### **5.4. Prueba de actividad inhibitoria**

Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron con cada una de las cepas BAL aisladas, de acuerdo con el procedimiento ilustrado en la figura 3 utilizando la técnica de la doble capa (Montville y Winkowski, 1997).

De las colonias aisladas, se seleccionó una, se sembró en un tubo conteniendo 5 mL de caldo MRS modificado y se incubó por 18 h a 25°C (Incubadora Ríos Rocha S. A.). Transcurrido este tiempo, se vaciaron 15 mL de agar MRS modificado en cajas Petri, una vez solidificado se dividió el fondo de la placa en cinco segmentos iguales y se depositó cuidadosamente una gota de 1.5  $\mu$ L de cada tubo conteniendo la BAL a ensayar en cada segmento, a una distancia suficiente para evitar su confluencia. Se dejó secar unos minutos en campana de flujo laminar (LABCONCO PURIFIER CLAS II) y se incubaron a 25°C por 24 h (Incubadora bacteriológica BLUE M). Una vez crecidas las colonias, en el centro de la placa se colocó un sensidisco con 7  $\mu$ L de antibiótico como testigo positivo de la prueba inhibición (Cuadro 12) y las placas se cubrieron con una sobre capa de 10 mL de agar Soya Trypticaseína suave (1%), el cual fue previamente inoculado con 20  $\mu$ L del microorganismo de prueba y se dejó solidificar durante veinte minutos. Las placas se incubaron por 24 h a 37°C. El efecto antibacteriano se detectó por la presencia de halos de inhibición mayores a 1 mm alrededor de las colonias de BAL.



**Figura 3.** Procedimiento para pruebas de actividad inhibitoria

**Cuadro 12.** Concentración de antibiótico utilizado para la prueba de actividad antimicrobiana.

Cepa	Antibiótico	Concentración utilizada
<i>Vibrio cholerae</i> no O1	Estreptomina	1mg/mL
<i>Vibrio cholerae</i> O1 Inaba	Estreptomina	1mg/mL
<i>Shigella sonnei</i>	Estreptomina	1mg/mL
<i>Escherichia coli</i>	Estreptomina	1mg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ampicilina	1mg/mL
<i>Citrobacter freundii</i>	Estreptomina	1mg/mL
<i>Proteus vulgaris</i>	Estreptomina	1mg/mL
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	Estreptomina	1mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	Estreptomina	1mg/mL
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	Estreptomina	1mg/mL

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1. Pureza de las BAL**

Se confirmó la pureza de 293 cepas identificadas como BAL aisladas de diversos productos lácteos elaborados artesanalmente y adquiridos en el Estado de Hidalgo, de las cuales se realizó la detección del espectro de actividad inhibitoria en contra de varios microorganismos de prueba.

Se observó la pureza de las cepas de BAL por la presencia de colonias de color blanco o cremoso, forma redonda, puntiforme, con bordes enteros y con superficie convexa, además de ser cocos o bacilos Gram positivos, catalasa y oxidasa negativas (Figura 4). En cada una de las cepas purificadas, se procedió a evaluar la actividad inhibitoria por el método antes mencionado contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Se seleccionó el agar MRS (Man-Rogosa-Sharpe) para la purificación de las BAL, debido a que este medio se caracteriza por la presencia de sales en cantidades relativamente importantes, especialmente de magnesio, ya que se ha comprobado que este metal estimula el crecimiento de algunas estreptobacterias como son las BAL. Además, la fuente glucosídica es la glucosa, el alimento nitrogenado es aportado por el extracto de carne y peptona, mientras que los factores de crecimiento son obtenidos por el extracto de levadura y el acetato de sodio junto con el Tween 80, tienen una acción selectiva combinados con el ajuste del medio a un pH inferior de 7 (Charles, 1998).

Se verificó la pureza de las cepas de BAL en agar MRS para asegurar que durante la detección de la actividad antimicrobiana no se encuentre contaminada con otra cepa de BAL o con alguna levadura, ya que cuando existe una población microbiana mixta activa como es la presencia de dos cepas de BAL en el medio utilizado para la prueba de actividad antimicrobiana, se propician relaciones entre los microorganismos. La presencia de una especie diferente a la cepa de BAL a ensayar en el medio de cultivo puede favorecer la actividad antimicrobiana de la bacteria láctica en contra de los microorganismos de prueba (sinergismo).



**Colonias de BAL**

**Figura 4.** Crecimiento típico de BAL en medio de cultivo sólido (Agar MRS)

Por lo contrario la presencia de otra especie, ya sea una levadura o BAL, puede interferir con la sobrevivencia de la BAL en estudio debido a que el microorganismo inhibe el desarrollo de la BAL (antagonismo), o bien provoca la inactivación de los microorganismos lo que puede conducir a resultados falsos negativos (Fernández, 2000).

Existen ensayos en los que intervienen más de dos especies de BAL para inhibir a los microorganismos patógenos y/o deterioradores. Bredholt y col., (1999) probaron el efecto sinérgico de cinco cepas de BAL actuando conjuntamente frente a diferentes microorganismos patógenos en productos cárnicos cortados y envasados al vacío a 10°C, donde *Escherichia coli* O157:H7 presente a una concentración de 10<sup>3</sup> UFC/g cuando crecía en presencia de 5 cepas de BAL a una concentración de 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> ufc/g, se vió inhibida totalmente. Estos investigadores no llegaron a determinar si el efecto inhibitorio tuvo que ver con una BAL determinada o con las 5 cepas actuando de manera sinérgica. Por ello es necesario verificar la pureza de las cepas de BAL para evitar un efecto sinérgico o bien antagónico que pueda ejercer influencia en la detección de la actividad antimicrobiana.

## **6.2 Prueba de actividad inhibitoria**

Para las pruebas de actividad antimicrobiana fue eliminada la glucosa de la formulación del caldo y agar MRS con el fin de evitar la producción de ácido láctico, el cual es un metabolito antimicrobiano que tiene un amplio espectro de inhibición cuando se encuentra disociado; sin embargo, la eliminación de este metabolito no impide la formación de otros compuestos inhibitorios capaces de realizar la inhibición en contra de los microorganismos de prueba. Por lo tanto, podemos suponer que el mecanismo de inhibición de las BAL en las pruebas en placa no fue por la producción del ácido láctico sino por acción de una bacteriocina u otro metabolito antimicrobiano originado por las BAL (González y col., 2004).

El ácido láctico es el principal producto de las BAL con actividad antimicrobiana contra bacterias y mohos. La formación de ésta sustancia puede generar resultados

falsos positivos cuando se quiere demostrar la actividad de producción de bacteriocinas. Por ejemplo, Juven y col. (1998) observaron que en carne molida empacada al vacío, después de varias semanas de almacenamiento a 4°C se incrementaba el número de *Listeria monocytogenes*. Posteriormente al incorporar al alimento *Lactobacillus alimentarius*, éste ejercía un efecto inhibitorio en el microorganismo patógeno al reducir la población inicial en el alimento. La BAL no era productora de bacteriocinas ni generaba algún otro metabolito como agua oxigenada, siendo la acción antibacteriana propiciada únicamente por el ácido láctico producido por el lactobacilo incorporado en la carne molida.

Se utilizaron antibióticos (Ampicilina y Estreptomicina) con una concentración de 1 mg/mL, como testigos positivos para la inhibición de los microorganismos patógenos y/o deterioradores, considerando la recomendación establecida en el trabajo realizado por González (2004), el cual expresa los valores conocidos para la actividad antibacteriana de cada antibiótico sobre cada uno de los microorganismos de prueba.

De acuerdo a los resultados de las cepas de BAL probadas, 24.57% mostraron actividad inhibitoria en agar MRS modificado contra al menos uno de los microorganismos de prueba, lo cual se observó mediante la formación de halos de inhibición que variaron de tamaño entre 1 y 8 mm. Algunas cepas de BAL mostraron halos de Inhibición inferiores a 1 mm, los cuales se indica como inhibición positiva ya que la cepa mostraba la tendencia de inhibición hacia el microorganismo aunque esta no puede medirse. Los resultados muestran mayor efecto inhibitorio contra los microorganismos Gram negativos, siendo la cepa de *Vibrio cholerae* la más sensible mientras que *E. coli* y *S. aureus* presentaron mayor resistencia al no ser inhibidas por ninguna de las BAL probadas (cuadro 13).

Existen reportes que presentan estudios sobre la sensibilidad de microorganismos patógenos y/o deterioradores ante las BAL (Savadogo y col., 2004;

**Cuadro 13.** Resultados de inhibición de BAL frente a microorganismos patógenos y/o deterioradores mediante la técnica de la doble capa.

	<i>Vibrio cholerae</i> no O1	<i>Vibrio cholerae</i> O1 Inaba	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A
BAL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
0104	-	2	-	-	-	-	-	2	-	-
0108	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
0201	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0204	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
0206	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
0401	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
0403	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
0503	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-
0504	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-
0505	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-
0506	4	2	-	-	-	-	-	-	-	-
0507	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0508	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
0603	1	-	-	-	-	-	-	-	-	6
0605	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
0609	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
0610	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
0701	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
0702	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
0704	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0903	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
0904	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0906	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1206	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1504	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1509	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
1603	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1605	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1606	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1607	3	3	-	-	-	-	1	-	-	3
1608	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1609	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-
1801	2	3	-	-	-	-	1	-	-	-
1802	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-

	<i>Vibrio cholerae</i> no O1	<i>Vibrio cholerae</i> O1 Inaba	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A
BAL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1807	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-
2101	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2102	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-
2105	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
2106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
2108	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-
2110	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2201	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2306	2	2	-	-	-	-	1	-	-	-
2403	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2405	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
2409	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2509	3	-	-	-	+	+	+	-	-	-
2510	3	-	3	-	-	-	-	-	-	-
2605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2606	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2608	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2609	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
2610	-	+	-	-	-	1	-	-	-	-
2704	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2705	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2801	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2802	-	+	2	-	-	-	-	-	-	-
2806	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2903	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3007	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3010	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
3104	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3106	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
3107	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
3108	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
3109	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3302	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
3306	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3308	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-
3309	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-
3310	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) Presentó inhibición menor a 1mm

(-) No presentó inhibición

Santillán, 2004; Yang, 2000). González y col. (2004) mostraron la actividad inhibitoria de cepas probióticas, donde la inhibición fue dirigida a 8 microorganismos patógenos (*Salmonella typhimurium*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Yersinia enterocolitica*). En este ensayo se utilizó la técnica de medición de halos de inhibición en placas de agar Luria inoculadas con los diferentes patógenos. Como testigos se usaron el cloranfenicol y cultivos sin sobrenadante.

De las cepas analizadas, los microorganismos patógenos con mayor sensibilidad a los compuestos generados por las cepas probióticas fueron *Salmonella typhi* y *Yersinia enterocolitica* mientras que una cepa de *E. coli* O157: H7 fue la más resistente; lo cual, coincide con los resultados obtenidos en este trabajo (González y col., 2004).

Al igual que los resultados en este trabajo, la actividad inhibitoria analizada por González y col. (2004), se inclinó hacia las bacterias Gram negativas, lo que hace sospechar que el mecanismo de acción antimicrobiana no está relacionado únicamente con la producción de bacteriocinas, ya que posiblemente se pudieron haber originado otros metabolitos de bajo peso molecular los cuales pueden penetrar con mayor facilidad la membrana exterior de la bacteria Gram negativa a diferencia de las bacteriocinas las cuales son compuestos de alto peso molecular que inhiben el desarrollo de especies relacionadas con la cepa productora de estos compuestos como señala la definición de Klaenhammer (1988). Sin embargo, recientemente este concepto se ha modificado ya que se han encontrado también efectos bactericidas contra cepas distanciadas de la cepa productora como los resultados expresados en el proyecto de González y col. (2004), así como los resultados mostrados en este trabajo.

Los resultados obtenidos pueden deberse a las diferencias que existen entre las bacterias Gram positivas y negativas. Estas diferencias se basan en que las bacterias Gram negativas contienen aparte de la pared celular una membrana externa que actúa como barrera selectiva al paso de algunas sustancias (macromoléculas como las

bacteriocinas o enzimas). Esta membrana consiste en una bicapa lipídica que contiene fosfolípidos (capa interna), lipopolisacáridos (capa externa) y proteínas que la atraviesan en todo su espesor y que delimitan poros hidrófilos (porinas) que permiten el paso de sustancias de bajo peso molecular por lo que la sensibilidad también es diferente (Prescott y col., 1999).

Las BAL producen las sustancias de bajo peso molecular las cuales pasan a través de las porinas afectando la permeabilidad de la membrana exterior hasta debilitarla o desintegrarla. Las sustancias que pueden generar este daño son la reuterina y el ácido piroglutámico, también la presencia de peróxido de hidrógeno, diacetilo y ácido láctico, como lo revelan los estudios realizados por Alakomi y col. (2000) donde observaron el efecto del ácido láctico en la permeabilidad de la membrana exterior de *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*, presentando como resultado la desintegración de la membrana exterior.

En este trabajo, de las cepas de BAL probadas pocas son las que presentaron la capacidad de inhibir a más de un microorganismo patógeno y/o deteriorador. Sólo las cepas 1607 y 2509 inhibieron a cuatro microorganismos y la cepa 1801 inhibió a tres microorganismos. Todas ellas fueron aisladas de queso Oaxaca y los halos de inhibición oscilaron entre 1 y 3 mm (Cuadro 14). Esto puede ser debido a que estas BAL generaron una mayor cantidad de compuestos con actividad inhibitoria o bien los microorganismos bajo estudio fueron más sensibles a los metabolitos producidos por las BAL.

Así la cepa 1607 logró inhibir a las especies de *Vibrio cholerae* no O1, *V. cholerae* O1 Inaba, *P. vulgaris* y *L. monocytogenes* Scott A, mientras que la cepa 2509 mostró su actividad antimicrobiana frente a las especies *V. cholerae* no O1, *C. freundii*, *K. pneumoniae* y *P. vulgaris*, en tanto que la cepa 1801 logro inhibir a *V. cholerae* no O1, *V. cholerae* O1 Inaba y *P. vulgaris*. El resto de las cepas que también presentaron actividad, sólo inhibieron una o dos de las diferentes cepas de los microorganismos

**Cuadro 14.** Número de microorganismos inhibidos por las cepas de BAL mediante la técnica de la doble capa.

BAL	No. de microorganismos inhibidos
0103	1
0104	2
0108	1
0201	1
0204	1
0206	1
0401	1
0403	2
0503	2
0504	2
0505	2
0506	2
0507	1
0508	1
0603	2
0605	1
0609	1
0610	2
0701	2
0702	2
0704	1
0903	1
0904	1
0906	1
1206	1
1504	1
1509	1
1603	1
1605	1
1606	1
<b>1607</b>	<b>4</b>
1608	1
1609	2
<b>1801</b>	<b>3</b>
1802	2
1807	1

BAL	No. de microorganismos inhibidos
2101	1
2102	2
2105	1
2106	1
2108	2
2110	1
2201	1
2306	2
2403	1
2405	1
2409	1
<b>2509</b>	<b>4</b>
2510	2
2605	1
2606	1
2608	2
2609	2
2610	2
2704	2
2705	1
2801	1
2802	2
2806	1
2903	1
3007	1
3010	1
3104	1
3106	1
3107	1
3108	1
3109	1
3302	1
3306	1
3308	2
3309	2
3310	2

estudiados. Esto puede deberse a que quizá la cantidad y/o concentración de metabolitos producidos no fue lo suficientemente adecuada para provocar un daño celular en los microorganismos estudiados para su inactivación o bien, los compuestos generados no le provocaron daño.

Existen ensayos enfocados en la actividad antimicrobiana (De Martinis y col., 2001; Santillán, 2004; Savadogo y col., 2004), en los cuales se ha observado la acción inhibitoria de la BAL en más de un microorganismo de prueba como lo indican los resultados expresados en el ensayo reportado por Santillán (2004), donde la cepa de BAL identificada como *Lactobacillus acidophilus* fue capaz de inhibir a las bacterias *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 y *Escherichia coli* ATCC 8739.

De los resultados obtenidos, las cepas aisladas del queso Oaxaca, un 25.75% mostraron capacidad inhibitoria, representando casi la mitad del total de las cepas que presentaron actividad contra los microorganismos de prueba, mientras que para el queso panela se encontró que el 22.22% de cepas de BAL aisladas tuvieron actividad antibacteriana, lo cual representa menos del 20% del total de las cepas con espectro inhibitorio (Cuadro 15). El haber obtenido un mayor número de cepas de BAL con capacidad antimicrobiana de los quesos Oaxaca y panela se debió a que se contaba con un mayor número de muestras

En los productos que se adquirieron en menor número, se obtuvo un número significativo de cepas con capacidad inhibitoria. En el caso de la leche, el 60% de las cepas de BAL aisladas presentó actividad antimicrobiana, el cual constituye el 8.33% del total de las cepas de BAL que presentaron inhibición, esto puede deberse a que la leche no recibió un tratamiento térmico para su conservación, por lo que la flora microbiana nativa de la leche incluyendo las cepas de BAL aún se encontraban presentes. En cuanto a las cepas aisladas del queso blanco, el 50% mostraron actividad antimicrobiana en contra de los microorganismos bajo estudio, siendo el 6.94% del total

**Cuadro 15.** Cepas con actividad inhibitoria aisladas de productos lácteos elaborados artesanalmente adquiridos en el Estado de Hidalgo

Producto	Total de BAL aisladas	Inhibición de microorganismos por producto (%)	Inhibición respecto al total de las cepas de BAL (%)
Queso Panela	45	22,22	16,67
Queso Oaxaca	132	25,76	47,22
Queso Canasto	30	6,67	2,78
Queso Doble Crema	12	16,67	2,78
Leche	10	60,00	8,33
Queso Ranchero	7	0	0
Queso Botanero	7	42,86	4,17
Queso Manchego	17	35,29	8,33
Queso Cotija	5	20,00	1,39
Queso Molido	9	0	0
Requesón	9	11,11	1,39
Queso Blanco	10	50,00	6,94

que mostraron inhibición. De igual importancia fueron los datos mostrados por el queso botanero y el queso manchego, ya que el 42.86% y el 35.29% respectivamente de las cepas de BAL aisladas de estos productos, presentaron inhibición antimicrobiana.

Por otro lado, en los quesos canasto, doble crema, cotija y en el requesón sólo se obtuvo el 6.67%, 16.67%, 20% y 11.64% respectivamente, de cepas de BAL con actividad inhibidora representando en cada una menos del 3% del total de las cepas de BAL que presentaron un espectro de inhibición en contra de los microorganismos patógenos y/o deterioradores.

Estos resultados son interesantes ya que se tratan de quesos artesanales en los cuales no hay adición de cultivos lácticos, además de que probablemente las condiciones para su fabricación no son las adecuadas ya que la leche utilizada no siempre recibe un tratamiento de pasteurización y en ocasiones, la leche sólo es calentada para su utilización, por lo que las BAL presentes pueden sobrevivir a este tratamiento y en algunos casos incluso se elabora el producto con leche bronca permitiendo que las BAL se encuentren activas aun durante todo el proceso de fabricación del queso. El desarrollo de las BAL en el queso también puede ser favorecido debido a que éste no recibe un tratamiento adecuado de refrigeración ya que se conserva a la temperatura que aportan los refrigeradores domésticos e incluso existen establecimientos que expenden el producto sin mantenerlo en refrigeración.

Cabe mencionar que, de los datos obtenidos, las cepas aisladas de los quesos rancho y molido no presentaron inhibición antimicrobiana frente a ninguno de los microorganismos de prueba. Estos resultados pueden ser debido a que las cepas de BAL presentes en estos productos no generan suficientes metabolitos antimicrobianos capaces de realizar la actividad inhibitoria en contra de los microorganismos de prueba. Además de que la cantidad de quesos adquiridos para el aislamiento de las cepas de BAL fue en menor proporción con el resto de los quesos adquiridos, por lo que posiblemente una cantidad mayor de muestras puede permitir el aislamiento de cepas de BAL con actividad antimicrobiana.

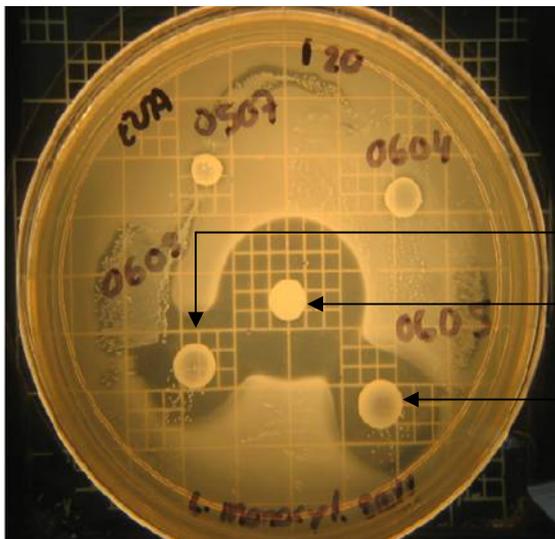
Además de productos lácteos se ha logrado aislar bacterias lácticas de productos como cárnicos, pescado, plantas, frutas y principalmente de alimentos fermentados los cuales presentaron un espectro antibacteriano en contra de especies como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* importantes para la salud pública y especies deterioradoras de alimentos (González y col., 2004; Santillán, 2004; Yang, 2000).

De manera similar a los resultados obtenidos en este trabajo, otros reportes han descrito que las BAL aisladas de la leche cruda, el 27.5% de 298 cepas mostraron actividad bactericida, mientras que el 68.6% de 86 cepas aisladas de ambientes acuáticos exhibieron actividad antimicrobiana, en general se ha demostrado que del total de cepas de BAL aisladas de diferentes alimentos fermentados, del 10 al 30% muestran actividad inhibitoria contra otras bacterias, mediante la producción de compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas (Santillán, 2004).

Cabe destacar que las cepas 0103, 0508, 0603, 0605, 1509, 1607 y 2108 presentaron inhibición contra la especie de *L. monocytogenes* Scott A y el grado de inhibición que se generó contra esta cepa fue variable, produciendo halos de entre 1 y 6 mm (Figura 5) lo cual es interesante, puesto que es una bacteria de particular interés en la salud pública, por ser un microorganismo patógeno para el hombre que ocasiona graves problemas materno/fetales, septicémicos o neurológicos. El microorganismo puede transmitirse a través del consumo alimentos contaminados ya que tiene la capacidad de sobrevivir y desarrollarse a temperaturas de refrigeración (Dromigny y col., 1994).

Con respecto a la inhibición de *L. monocytogenes* existen varios reportes que muestran estudios sobre la sensibilidad de éste microorganismo a diversos compuestos antimicrobianos producidos por las BAL (González y col., 2004; Mendoza y col., 2004; Sánchez 2003; Santillán, 2004). De Martinis y col. (2001) aislaron BAL de carne y productos cárnicos, de las cuales se identificó a tres cepas de BAL con características

*Listeria monocytogenes* Scott A



Cepa de BAL 0603

Testigo positivo

Cepa de BAL 0605

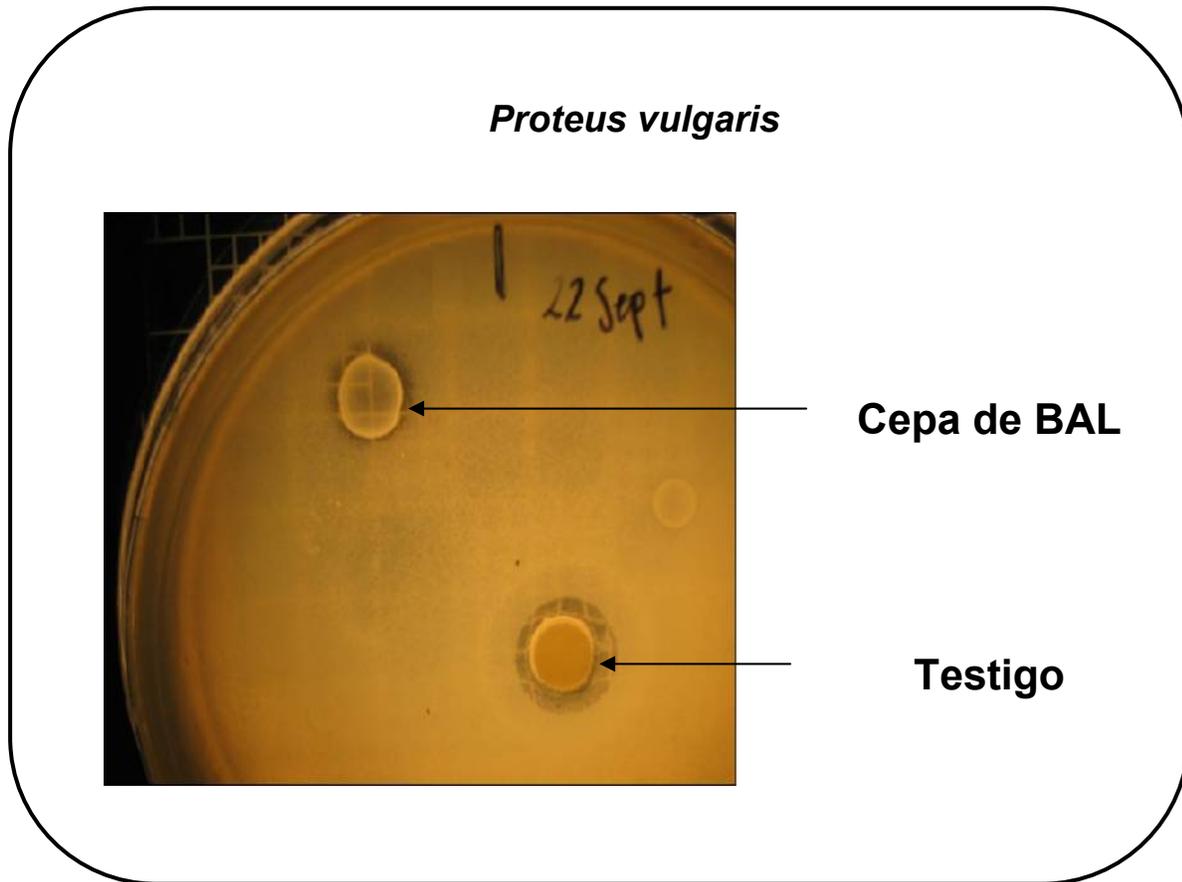
**Figura 5.** Actividad inhibitoria de las cepas 0603 y 0605 de BAL contra *Listeria monocytogenes* Scott A en agar MRS modificado utilizando la técnica de la doble capa. Como testigo positivo se utilizó estreptomicina a una concentración de 1 mg/mL.

antimicrobianas *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc* y *Leuconostoc* sp.), posteriormente se determinó la actividad inhibitoria hacia especies de *L. monocytogenes* y *E. coli* ATCC 29522. En este ensayo se determinó el espectro de actividad en agar MRS mediante el método de difusión de agar usando a la cepa *Lactobacillus sake* ATCC 15521 como microorganismo indicador de inhibición, obteniendo como resultado la inhibición de *L. monocytogenes* por la producción de una bacteriocina, mientras que la especie de *E. coli* ATCC 29522 mostró resistencia ante la inhibición.

Al igual que los resultados expresados por De Martinis y col. (2001) y los mostrados en este trabajo indican que la especie de *E. coli* mostró resistencia ante la actividad inhibitoria. En el caso de *L. monocytogenes*, en ambos ensayos la bacteria fue sensible ante la producción de compuestos antimicrobianos producidos por BAL, sin embargo existe la diferencia de que en este trabajo aún se desconoce el compuesto implicado en la actividad antimicrobiana pero existe la posibilidad de que el espectro antibacteriano originado sea por la acción de una bacteriocina.

De acuerdo a los resultados mostrados en este trabajo las BAL en estudio presentaron actividad inhibitoria contra la mayoría de bacterias Gram negativas probadas, tal es el caso de *P. vulgaris* que fue inhibido por el 3.41% de las BAL, con un halo de inhibición generado entre 1-2 mm (Figura 6). Mientras que para cada una de las cepas de *S. sonnei*, *C. freundii*, *S. typhi* ATCC 6539 y *K. pneumoniae* mostraron inhibición menor al 3%, siendo *E. coli* la más resistente al no presentar actividad inhibitoria (Cuadro 16).

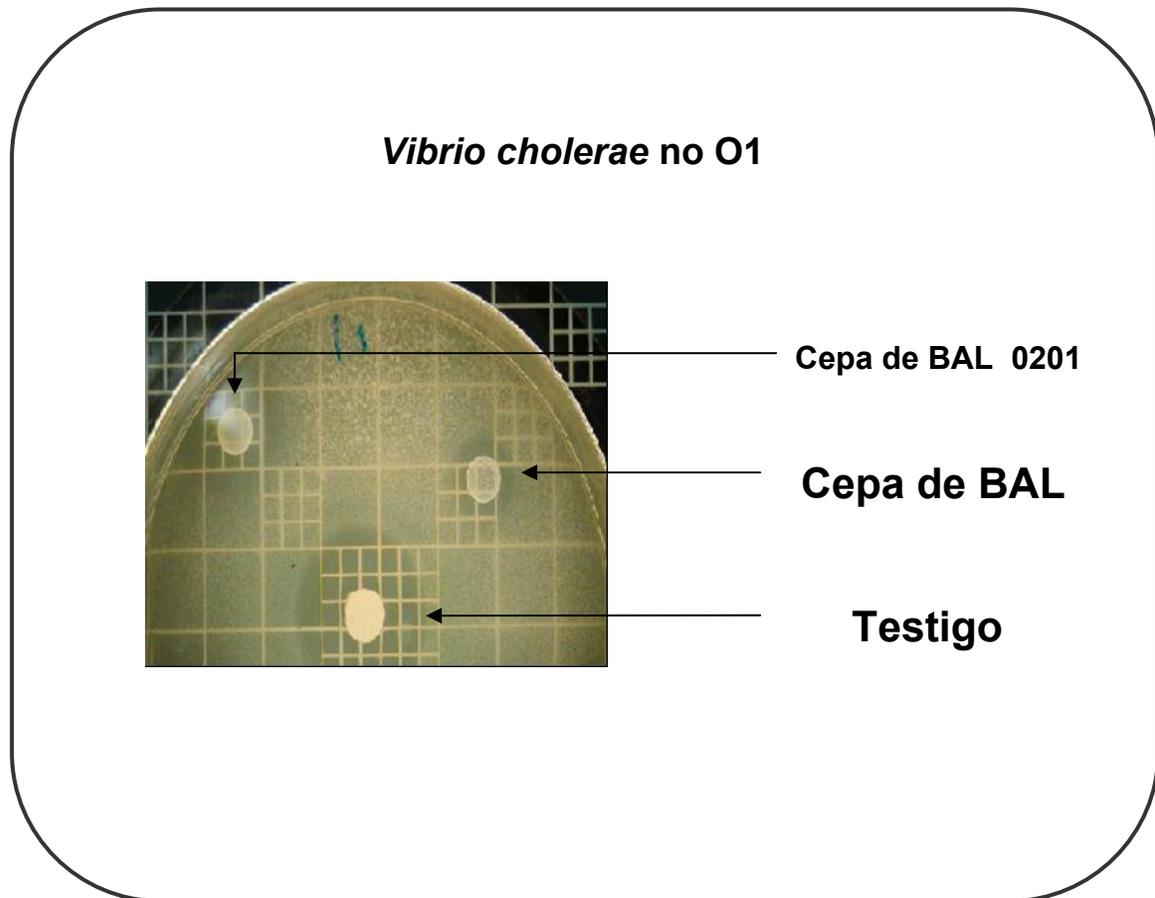
Se observó también que las especies de *V. cholerae* no O1 y *V. cholerae* O1 Inaba fueron inhibidas por las BAL en mayor proporción, ya que el 15.02% y el 12.29% respectivamente de las cepas de BAL analizadas las inhibieron, generando un halo de inhibición entre 1 y 7 mm (Figura 7).



**Figura 6.** Actividad inhibitoria de la cepa 1206 de BAL contra *Proteus vulgaris* en agar MRS modificado utilizando la técnica de la doble capa. Como testigo positivo se utilizó estreptomicina a una concentración de 1 mg/mL.

**Cuadro 16.** Inhibición de microorganismos patógenos y/o deterioradores por cepas de BAL mediante la técnica de la doble capa.

Cepa	BAL con actividad inhibitoria	Inhibición respecto al total de las cepas de BAL (%)	Zona de inhibición (mm)
<i>Vibrio cholerae</i> no O1	44	61.11	1-7
<i>Vibrio cholerae</i> O1 Inaba	36	50	1-3
<i>Shigella sonnei</i>	2	2.78	2-3
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2.78	1
<i>Citrobacter freundii</i>	2	2.78	1
<i>Proteus vulgaris</i>	10	13.89	1-2
<i>Salmonella typhi</i> ATTCC 6539	2	2.78	2-8
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	7	9.72	1-6



**Figura 7.** Actividad inhibitoria de las cepas 0201 y 0704 de BAL contra *Vibrio cholerae* no O1 en agar MRS modificado utilizando la técnica de la doble capa. Como testigo positivo se utilizó estreptomicina a una concentración de 1 mg/mL.

Aunque existen pocos estudios relacionados con la sensibilidad de especies de *V. cholerae* por la acción de BAL, el resultado obtenido en este trabajo muestra que ésta bacteria fue sensible ante la actividad antimicrobiana de las cepas de BAL aisladas. Posiblemente éste efecto se debió a la producción de ácidos orgánicos diferentes al ácido láctico generados por las BAL, los cuales junto con la disminución de pH ejercen un efecto inhibitorio en contra de las cepas de *Vibrio cholerae*. Debido a que éste género es muy sensible a la acidez, un medio ácido como lo es el generado por los metabolitos de las BAL puede ejercer un efecto antimicrobiano en éste microorganismo. Aunque no se utilizó glucosa en la composición del medio para evitar la formación de ácido láctico que pudiera interferir con la actividad inhibitoria de otros compuestos, ésta condición no evita la formación de otros ácidos orgánicos como el ácido acético y ácido propiónico generados por el metabolismo de las BAL (Fernández, 2000).

Con las cepas de *S. aureus* y *E. coli* no se detectó actividad inhibitoria por parte de alguna BAL, por lo que se sugiere para estudios posteriores la utilización de otro método o la utilización de agentes antimicrobianos como algún agente quelante (EDTA), HCl, o la combinación de bacteriocinas para el tratamiento de estos microorganismos ya que presentaron resistencia ante las BAL, también se puede optar por la acidificación del medio mediante la producción de ácido láctico y la disminución del pH, como lo sugieren los estudios realizados por Alakomi y col. (2000), en donde evaluó el efecto del ácido láctico, EDTA, KCN y HCl en la permeabilidad de la membrana de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*, obteniendo como resultado la desintegración de la permeabilidad de la membrana exterior.

Además de los estudios presentados por Alakomi y col. (2000), se han reportado estudios en donde, cuando se adicionan compuestos como EDTA, HCl o KCN en combinación con bacteriocinas, estos proporcionan barreras que evitan el crecimiento de microorganismos patógenos en los alimentos. Mendoza y col. (2004) han estudiado la combinación de bacteriocinas (nisina y pediocina) con ácido láctico y EDTA en contra

de *Escherichia coli* 0157:H7 y *Listeria monocytogenes* de interés en la salud pública.

Para *E. coli* la combinación nisina-EDTA disminuyó su crecimiento, mientras que la combinación pediocina-EDTA-nisina-ácido láctico, nisina-EDTA-ácido láctico, ácido láctico y nisina-pediocina-ácido láctico, además de presentar una disminución en el crecimiento de *L. monocytogenes*, también se observó un sinergismo entre el agente quelante y el pH ácido del medio.

En el caso de *L. monocytogenes*, la pediocina alargó la fase de crecimiento, y presentó inhibición con los tratamientos pediocina-nisina- ácido láctico -EDTA, pediocina-nisina- ácido láctico, ácido láctico y pediocina- ácido láctico. La combinación de bacteriocinas y ácido láctico proveen de barreras adicionales evitando el crecimiento de microorganismos patógenos en los alimentos. El EDTA actúa eliminando los iones calcio que estabilizan la capa de lipopolisacáridos liberando una parte de ellos de membrana exterior de las bacterias Gram negativas (Mendoza y col., 2004; Schillinger y col., 1996).

Aún no se sabe con exactitud que compuesto o compuestos son los responsables de la inhibición de los microorganismos de prueba, aunque se tomaron medidas para disminuir la producción de otros metabolitos como la eliminación de glucosa para evitar la formación de ácido láctico, esta condición no evita la formación de otros compuestos antimicrobianos como peróxido de hidrógeno, reuterina y diacetilo, que puedan actuar en contra de los microorganismos patógenos y/o deterioradores, en especial de las bacterias Gram negativas, por lo que es necesario realizar estudios posteriores, como la identificación de estos compuestos y de las BAL implicadas, así como una purificación de las sustancias inhibitorias para determinar con mayor precisión si la actividad mostrada es por la acción de alguna bacteriocina o de algún otro compuesto producido por las BAL.

## 7. CONCLUSIONES

- ✎ De las 293 cepas de BAL en estudio, el 24.57% mostraron actividad antibacteriana contra al menos uno de los microorganismos patógenos y/o deterioradores de prueba.
- ✎ De las cepas de BAL en estudio sólo se obtuvo inhibición en contra de bacterias Gram negativas.
- ✎ La mayoría de cepas con actividad inhibitoria fueron obtenidas de los quesos Oaxaca y panela.
- ✎ Del total de las cepas de BAL probadas el 9.72 % mostraron inhibición contra *Listeria monocytogenes* Scott A, lo cual es interesante debido a la importancia de este microorganismo para la salud pública.
- ✎ Se comenzó con la integración de un banco de cepas BAL con capacidad inhibitoria para la posterior caracterización de los microorganismos y de los compuestos antimicrobianos producidos.
- ✎ Se recomienda continuar con la purificación e identificación de los compuestos antimicrobianos involucrados en la actividad inhibitoria, con el fin de lograr su caracterización y su posterior utilización en diversos alimentos.

## 8. REFERENCIAS BLIOGRÁFICAS

Adams, M. R. y Moss M. O. (1998). Microbiología de los alimentos. (Eds). ACRIBIA, Zaragoza España pp. 321-330.

Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K. y Helande, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Biotechnology*, FIN-02044 VTT, Espoo, Finland.

Amiot, J. (1991). Ciencia y tecnología de la leche. (Eds). ACRIBIA, Zaragoza, España pp. 100-101.

Axelsson, L. T. (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: *Lactic Acid Bacteria*, Salminen, S. y von Wright, A. (Eds) Marcel Dekker, Nueva York pp. 1-53.

Bredholt, P. S., Nesbakken, T. y Holk, A. (1999). Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum and gas packaged meat. *Journal of Food Microbiology* 53: 43-52.

Blackburn, C. W. y McClure, P. J. (2002). Foodborne pathogens. (Eds). Wood Head Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra.

Casp, V. A. y Requena, J. A. (1999). Procesos de Conservación de Alimentos, Colección de Tecnología de Alimentos. (Eds). Mundi-Prensa, Madrid España pp. 97-98.

Centers for Disease Control and Prevention (1983). Outbreak of *Citrobacter freundii* associated with Camembert cheese in Washington D. C. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1983;32(41).

- Centers for Disease Control and Prevention. (1995). Outbreak of Salmonellosis Associated With Beef Jerky--New Mexico, *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1995;44 (42).
- Centers for Disease Control and Prevention (2002). Public Health Dispatch: outbreak of Listeriosis Northeastern United States, *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2002; 51(42):950-951.
- Charles, A. (1998). *Ciencia de la Leche, Principios de la Técnica Lechera*. (Eds). Continental, México pp. 267-302.
- De Martinis, E. C. P., Públio M. R. P., Santarosa P. R. y Freitas F. Z. (2001). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology* 32(1).
- Dromigny, E., Vincent, J. y Jouve, J. (1994). *Campylobacter, Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica*. En: *Microbiología Alimentaria, Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*, Vol. 1. Bourgeois, C. M., Mescle, J. F y Zucca, J. (Eds). ACRIBIA, Zaragoza, España pp.113-129.
- Early, R. (2000). *Tecnología de los productos lácteos*. (Eds). ACRIBIA, Zaragoza España pp. 79-99.
- Erich, L. y Martín, J. (1995). *Conservación Química de los Alimentos, Características, Usos, Efectos*. (Eds). ACRIBIA, Zaragoza España pp. 310-311.
- Fernández, E. E. (2000). *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México pp. 105-110.
- Frazier, W. C. y Westhoff D. C. (2000). *Microbiología de los alimentos*, Cuarta edición. (Eds) ACRIBIA, Zaragoza, España pp. 61-64.

- González, H. M. Y. (2004). Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de cuatro plantas del género *Stevia* y cuatro plantas del género *Mimosa*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- González, M. B. E., Gómez, T. M. y Jiménez, S. Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Publica y Nutrición* 4: 10-20.
- González, M. B. E., Gómez, t. M. y Jiménez, S. Z. (2004). Actividad antimicrobiana *in vitro* de cepas de probióticos aisladas de alimentos. *Revista Salud Pública y Nutrición*. Edición Especial No. 4-2005.
- Holzappel, W.H y Wood, B.J.B. (1995). Lactic acid bacteria in contemporary perspective, En: *The genera of lactic acid bacteria*. Holzappel, W.H y Wood, B.J.B. (Eds). Chapman and Hall press, Gran Bretaña pp. 1-5.
- Jay, J. M. (1992). Microbiología moderna de los alimentos. (Eds). ACRIBIA, Zaragoza España pp. 441-449.
- Juven, B. J., Barefoot, S. F. y Pierson, M. D. (1998). Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged ground beef inoculated with *Lactobacillus alimentarius* FloraCarn L-2. *Journal of Food Protection* 61:551-556.
- Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70:337-349.
- Larpent, J. P. (1994). Las Bacterias lácticas. En: *Microbiología Alimentaria. Fermentaciones alimentarias*, Vol. 2. Bourgeois, C. M., Mescle, J. F y Zucca, J. (Eds). ACRIBIA, Zaragoza, España pp. 3-15.
- Leveau, J. y Bouix, M. (2000). Microbiología Industrial, Los microorganismos de interés industrial. (Eds). ACRIBIA, Zaragoza, España pp. 220-242.

- Leroy, F., Degeest, B. y De Vuyst, L. (2002). A novel area of predictive modeling: describing the functionality of beneficial microorganisms in foods. *International Journal of Food Microbiology* 73; 251-259.
- Lyhs U. (2002). Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki pp. 9-10.
- Madrid V. A. (1999). Tecnología quesera, Segunda Edición. (Eds). Mundi-Prensa, Madrid, España. pp 82-85.
- Mendoza G. P., López G. L. K. y Escudero A. B. I. (2004). Efecto de la combinación de nisina, pediocina y ácido láctico sobre patógenos en alimentos. *Revista Salud Pública y Nutrición*. Edición Especial No. 4-2005.
- Mescle, J. F. y Zucca, J. (1994) El comportamiento de los microorganismos en los alimentos. En: *Microbiología Alimentaria. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*, Vol. 1. Bourgeois, C. M., Mescle, J. F y Zucca, J. (Eds). ACRIBIA, Zaragoza, España pp. 9-50.
- Montville, T.J. y Winkowski, K. (1997). Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. En: *Food microbiology, fundamentals and frontiers*. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J. (Eds). ASM Press, Washington, D.C. pp. 557-577.
- Moreno, B., Diez, V., García, Ma. L, Menes, I. Gutiérrez, L. M. y Francisco, P. J.J. (1983). Microorganismos de los alimentos 1, Técnicas de análisis microbiológico. Segunda edición, Vol. 1, ICMSF.(Eds). ACRIBIA, Zaragoza, España.
- Oscáriz, J. C. y Pisabarro, A. G. (2001). Classification and mode of action of membrana-active bacteriocins produced by gram positive bacteria. *International Microbiology*. 4:13-19.

- Ouwehand, A. C. (1993). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: *Lactic Acid Bacteria*, Salminen, S. y Von Wright A. (Eds). Marcel Dekker, Nueva York pp. 139-154.
- Piard, J. C. y Desmazeud, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria  
2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait* 72:113-142.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. y Klein, D. A. (1999). Microbiología, Cuarta edición. (Eds).  
Mc Graw Hill Interamericana, Zaragoza España pp. 955-957.
- Sánchez, O. I. (2003). Uso del permeado de suero suplementando en la producción de bacteriocinas y su aplicación en la bioconservación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Querétaro pp. 5-15.
- Santillán, M. A. (2004). Aislamiento y caracterización de cepas bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo pp. 1-11.
- Savadogo. A., Ouattara C. A. T., Bassole I. H. N., Traore A. S. (2004). Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from burkina faso fermented milk. *Pakistan Journal of Nutrition* 3 (3):174-179.
- Scientific Status Summary. (2004). Bacteria Associated with Foodborne Diseases, report of the *Institute of Food Technologists*, Washington, D.C. pp. 1-25.
- Schillinger, U., Geisen, R. y Holzapfel, W. H. (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocinas for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science & Technology* May 7;158-164.

Soomro, A.H., Masud T., y Anwaar K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. *Pakistan Journal of Nutrition* 1(1): 20-24.

Stiles, M. E. y Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36:1-29.

Vandamme P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. y Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* 60(2): 407-438.

Yang, Z. (2000). Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties University of Helsinki. Department of Food Technology pp. 9-13.

[www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov). (2005). Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook.