



INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICA EN ALIMENTOS

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE
CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS
DE PRODUCTOS LÁCTEOS**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

AIDE NERIA PÉREZ

ASESORES:

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

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO 2006



Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la asesoría de la Dra. Armida Zúñiga Estrada y de la M. en C. Irais Sánchez Ortega, formando parte del proyecto “Obtención de cultivos iniciadores productores de bacterias de aplicación en la industria láctea” financiado por SAGARPA-CONACyT con clave SAGARPA-2003-C 01-144.



Los resultados de este trabajo fueron presentados en los siguientes congresos:

VII Congreso de Ciencia de los Alimentos 2005, Guanajuato, Gto. Título del trabajo:

1. Aislamiento y detección de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas aisladas de quesos.

Congreso de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. 2005, Mérida, Yucatán. Título de los trabajos:

1. Caracterización de bacterias lácticas aisladas de productos lácteos fermentados artesanalmente.
2. Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas aisladas de quesos elaborados artesanalmente en el Estado de Hidalgo.

DEDICATORIAS:

Con este trabajo realizo una de mis metas pero esto no seria posible sin todas las bendiciones recibidas por el Todo Poderoso y que agradezco por siempre.

Dios me ha dado la mejor de las familias. Una mamá que con sus oraciones, su amor, su comprensión, dedicación, tolerancia y amor todo ha sido más fácil. Un papá que ha sacrificado su tiempo por darme lo que necesito y que nunca deja de darme palabras de aliento además de su gran amor. Un hermanito que compartió conmigo la mejor etapa de mi vida (la infancia) y que a pesar de la distancia me demuestra su amor todos los días. Una hermanita que admiro por su fortaleza para enfrentar los obstáculos que se le presentan y que me contagia de su alegría.

¡LOS QUIERO MUCHO!

A Pablo por estar siempre conmigo, por su gran ayuda y por el amor de siempre.

AGRADECIMIENTOS:

A DIOS por darme la oportunidad de vivir y de guiar mis pasos todos los días

*A mi familia por la confianza, el apoyo, el ejemplo de fortaleza y por todo su amor ¡Gracias!
Mamita, Papi, Adri y Arturo.*

A la Dra. Armida Zúñiga Estrada y a la M. en C. Irais Sanchez Ortega por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por su apoyo y confianza.

A los integrantes del jurado Dr. Javier Castro Rosas, Dr. Santiago Filardo Kerstupp, Dra. Eva María Santos López, Dra. Alma Delia Román Gutiérrez y Dra. María Angelica Gutierrez Nava. Gracias por brindarme sus conocimientos.

A Enrique por hacer que estos años hayan sido más agradables, por escucharme, por quererme a su manera y por todo el apoyo.

Quiero agradecer de manera especial a Lili su amistad, el tiempo compartido y la ayuda que me brindo ya que no hubo necesidad de llamarla siempre estaba ahí.

A Luis Alberto por compartir desde bromas hasta enfados, a mis amigos Julia y Abraham con los que pase momentos muy agradables, a los que me brindaron su amistad Miriam, Andresito, Oswaldo y Enrique.

A mi compañera Socorro Ramirez, gracias por su ayuda y compañía en la realización de este trabajo y a Tina por su sentido del humor que hizo los días más agradables y por las facilidades que me brindo en el laboratorio de Biotecnología .

A mis amigos del LESP, María Cruz por escucharme y compartir su tiempo conmigo, Alma Delia por alentarme durante estos años, Liss por dedicarme parte de tu tiempo y por escuchar mis locuras, Gaby, Erika y Ernesto gracias por su amistad.

ÍNDICE GENERAL

	Paginas
INDICE DE FIGURAS	III
INDICE DE TABLAS	IV
ABREVIATURAS	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Bacterias ácido lácticas	3
2.1.1. Características generales	3
2.1.2. Metabolismo	4
2.1.3. Clasificación y géneros representativos	7
2.1.4. Métodos de estudio clásicos	11
2.1.5. Importancia de las BAL	12
2.1.6. Compuestos antimicrobianos producidos por BAL	13
2.1.6.1. Ácidos orgánicos	15
2.1.6.1.1. Ácido láctico	15
2.1.6.1.2. Ácido acético	15
2.1.6.2. Bacteriocinas	16
2.1.6.2.1. Definición	16
2.1.6.2.2. Clasificación	17
2.1.6.2.3. Mecanismo de acción	19
2.1.6.3. Otros compuestos	20
2.2. Productos fermentados	22
2.2.1. Leches fermentadas	22
2.2.2. Quesos	23
2.3. Microorganismos patógenos y/o deterioradores de importancia en los alimentos	25

2.3.1. <i>Vibrio</i>	27
2.3.2. <i>Shigella</i>	28
2.3.3. <i>Salmonella</i>	30
2.3.4. <i>Escherichia coli</i>	32
2.3.5. <i>Listeria</i>	33
2.3.6. <i>Bacillus, Enterobacter, Proteus y Klebsiella</i>	34
2.4 Microorganismos patógenos de importancia en quesos	36
3. JUSTIFICACIÓN	39
4. OBJETIVOS	40
5. MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1. Material biológico	41
5.2. Desarrollo experimental	44
5.3. Pruebas para verificar la pureza de las cepas de BAL	45
5.4. Pruebas de actividad inhibitoria	47
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
6.1. Purificación de cepas de BAL	50
6.2. Actividad inhibitoria de BAL	51
6.3 Cepas de BAL que mostraron actividad inhibitoria	54
6.3.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	61
6.3.2. <i>Lactobacillus pentosus</i>	63
6.3.3. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	64
6.3.4. <i>Lactobacillus brevis</i>	66
6.3.5. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	68
6.3.6. <i>Lactococcus raffinolactis</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	69
7. CONCLUSIONES	73
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Paginas
1	Vía homofermentativa de la glucosa por BAL	5
2	Vía heterofermentativa de la glucosa por BAL	6
3	Diagrama experimental del proyecto	44
4	Diagrama del procedimiento para verificar la pureza de BAL	46
5	Diagrama del procedimiento de las pruebas de actividad inhibitoria	48
6	Inhibición del crecimiento de la bacteria de prueba por BAL	51
7	Actividad inhibitoria de las <i>Lactobacillus pentosus</i> frente a <i>L. monocytogenes</i>	57
8	Cepas de BAL que no mostraron actividad inhibitoria frente a <i>Proteus mirabilis</i>	59
9	Actividad inhibitoria de <i>Lactobacillus plantarum</i> frente a bacterias de prueba	62
10	Actividad inhibitoria de <i>Lactobacillus pentosus</i> frente a bacterias de prueba	64
11	Actividad inhibitoria de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i> frente a bacterias de prueba	65
12	Actividad inhibitoria de <i>Lactobacillus brevis</i> frente a bacterias de prueba	67
13	Actividad inhibitoria de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> frente a bacterias de prueba	69
14	Actividad inhibitoria de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> frente a bacterias de prueba	70
15	Actividad inhibitoria de <i>Lactobacillus raffinolactis</i> frente a bacterias de prueba	71

INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Paginas
1	Bacterias ácido lácticas homofermentativas, heterofermentativas y heterofermentativas facultativas	8
2	Principales microorganismos probióticos y algunos de sus efectos benéficos para la salud	13
3	Compuestos inhibitorios producidos por BAL y su mecanismo de acción	14
4	Bacteriocinas y microorganismos productores	18
5	Bacteriocinas producidas por BAL y microorganismo sensibles	20
6	Atributos que debe presentar un alimento	25
7	Especies de <i>Vibrio</i> spp que causan o están asociados con infecciones en humanos	28
8	Clasificación de las especies del género <i>Shigella</i>	29
9	Persistencia de <i>Salmonella</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 durante la elaboración de queso Oaxaca	36
10	Factores relacionados con el microorganismo, el individuo y el alimento consumido como potenciales determinantes de un incidente	37
11	Número de cepas de BAL aisladas e identificadas bioquímicamente	42
12	Concentración del antibiótico utilizado como control positivo	49
13	Origen de las cepas de BAL que presentaron actividad inhibitoria	53
14	Cepas de BAL que presentan actividad inhibitoria frente a una o más bacterias de prueba	55
15	Número de cepas de BAL que inhibieron a las bacterias de prueba	58
16	Porcentaje de cepas de BAL con actividad inhibitoria por género y especie	61

ABREVIATURAS

ATCC	Colección Americana de Cultivos Puros
BAL	Bacterias ácido lácticas
°C	Grados Celsius
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
EPM	Vía Embden-Meyerhof-Parnas
FDA	Administración de Alimentos y Drogas
GRAS	Generalmente Reconocidas Como Seguras
h	Hora
HACCP	Análisis de riesgos y puntos críticos de control
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
LCDC	Laboratorio central de control de enfermedades
NOM	Norma Oficial Mexicana
min	Minutos
mL	Mililitros
MRS	Medio de Man-Rogosa-Sharpe
s	Segundo
UI	Unidades internacionales
µL	Microlitros

1. INTRODUCCIÓN

La microbiología industrial es la disciplina que utiliza microorganismos generalmente cultivados a gran escala, para obtener productos comerciales de valor o para realizar importantes transformaciones químicas, como es el caso de las bacterias ácido lácticas (BAL) que son un grupo de bacterias Gram positivas que tienen en común características morfológicas, metabólicas y fisiológicas, las cuales son aprovechadas en la industria para la fabricación y conservación de alimentos (Axelsson, 1993).

Pasteur descubrió estos microorganismos en 1857 mientras realizaba estudios sobre la fermentación láctica, alcohólica y butírica, denominándolos lactobacterias, con lo cual se dio la pauta para la aplicación de las BAL en los procesos de elaboración de diversos productos lácteos (Hoover y Stenson, 1993).

Se ha confirmado que los alimentos fermentados se conservan bien por el efecto que las BAL producen al convertir los azúcares en ácidos orgánicos principalmente ácido láctico y por la remoción de gran cantidad de carbohidratos durante la fermentación estas son las primeras acciones que llevan a cabo estas bacterias en los alimentos fermentados. Además la fermentación tiene como propósito introducir cambios muy específicos en el aroma, sabor, textura, cuerpo, acidez, humedad, digestibilidad y aspecto de los alimentos (Fernández, 2000).

Entre las BAL comúnmente usadas para la producción de alimentos fermentados se encuentran los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* y *Leuconostoc*, los cuales pueden ser aislados de diferentes fuentes como, granos, plantas, vegetales fermentados, productos lácteos, cárnicos y mucosas de animales (Jay, 2000).

Diversos metabolitos producidos por las BAL se usan como cultivos iniciadores, como el ácido láctico, diacetilo, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Estos metabolitos ejercen acción antibacteriana lo que contribuyen a prevenir la descomposición de los alimentos, mejorando la calidad microbiológica o

ampliando la vida de anaquel, a este proceso se le define como bioconservación (Stiles, 1996).

La inocuidad de los alimentos es una cuestión fundamental de salud pública para todos los países. Las enfermedades transmitidas por los alimentos como consecuencia de su contaminación con patógenos microbianos, biotoxinas y compuestos químicos representan graves amenazas para la salud de miles de millones de personas. Recientemente se han documentado en todos los continentes brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, lo que demuestra su importancia desde el punto de vista social y de la salud pública. Estas enfermedades no sólo repercuten de forma significativa en la salud y bienestar de las personas, sino que tienen consecuencias económicas para los individuos, las familias, las comunidades, las empresas y los países. Por lo anterior se pone una considerable atención a los sistemas de salud.

Como un aporte al conocimiento del desarrollo de compuestos con actividad antimicrobiana, esta tesis tiene como objetivo evaluar la actividad inhibitoria de 280 cepas de BAL aisladas de productos lácteos, para posteriormente realizar un estudio sobre su posible uso en la fermentación y conservación de alimentos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Bacterias ácido lácticas (BAL)

En 1919 Orla-Jensen elaboró una monografía en la que apunta que “las verdaderas bacterias del ácido láctico constituyen un grupo natural de bacilos y cocos Gram positivos, inmóviles, no esporulados que al fermentar azúcares forman principalmente ácido láctico”, además de que son catalasa y oxidasa negativas, sin citocromos, anaerobias pero aerotolerantes, acidúricas y estrictamente fermentativas con producción de ácido láctico como principal producto final. Se desarrollan bien en un hábitat rico en nutrientes (cárnicos y lácteos) y mucosas del cuerpo de mamíferos como boca, intestino y vagina (Jay, 2000).

2.1.1. Características generales

Las BAL se caracterizan por numerosas exigencias nutricionales, ya que pueden crecer en medios ricos en vitaminas, bases nitrogenadas y fuentes de carbono, como la leche, productos lácteos, vegetales en descomposición, carnes, etc. Las vitaminas necesarias están presentes en la leche en concentraciones generalmente suficientes pero la adición a la leche de extracto de levadura rico en vitaminas mejora el crecimiento bacteriano; ciertas vitaminas no son esenciales pero tienen un efecto estimulante sobre el crecimiento (Leveau y Bouix, 2000).

Existen diversas características que nos permiten diferenciar los géneros de las BAL, como la forma de fermentar la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) y el crecimiento a diferente pH, entre otros. El grupo de las BAL esta conformado por los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus* y *Carnobacterium* (Jay, 2000).

2.1.2 Metabolismo

Desde el punto de vista bioquímico, fermentación es el proceso metabólico en el que los carbohidratos y los compuestos afines son oxidados con liberación de energía en ausencia de aceptores externos de electrones. Los aceptores finales de electrones son compuestos orgánicos producidos directamente en el desdoblamiento de los carbohidratos. En la fermentación se produce la oxidación incompleta del compuesto originario y solamente una pequeña cantidad de la energía es liberada durante el proceso (Jay, 2000).

En base a los productos finales del metabolismo de la glucosa, las BAL se dividen en dos grupos:

1. Las que producen ácido láctico como producto principal o único de la fermentación de la glucosa se denominan homofermentativas (Figura 1). Utilizan la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Las bacterias homolácticas poseen las enzimas aldolasa y hexoisomerasa, pero carecen de fosfoacetolasa. Así mismo, es posible cambiar el carácter homofermentativo de las bacterias modificando condiciones de cultivo como la concentración de glucosa, el pH y la restricción de nutrientes (Leveau y Bouix, 2000).
2. Las heterofermentativas (Figura 2) son las que transforman la glucosa a partir de las hexosas, en ácido láctico, etanol, ácido acético, ácido fórmico, succinato, y dióxido de carbono (CO₂) (Axelsson, 1993). Todas las especies de *Leuconostoc*, así como algunos lactobacilos, son microorganismos heterofermentativos. Las heterolácticas por otra parte tienen fosfoacetolasa pero no poseen aldolasa ni hexosaisomerasa y, en lugar de degradar la glucosa por la vía de EMP, estos microorganismos utilizan la vía del monofosfato de hexosa o de las pentosas (Leveau y Bouix, 2000).

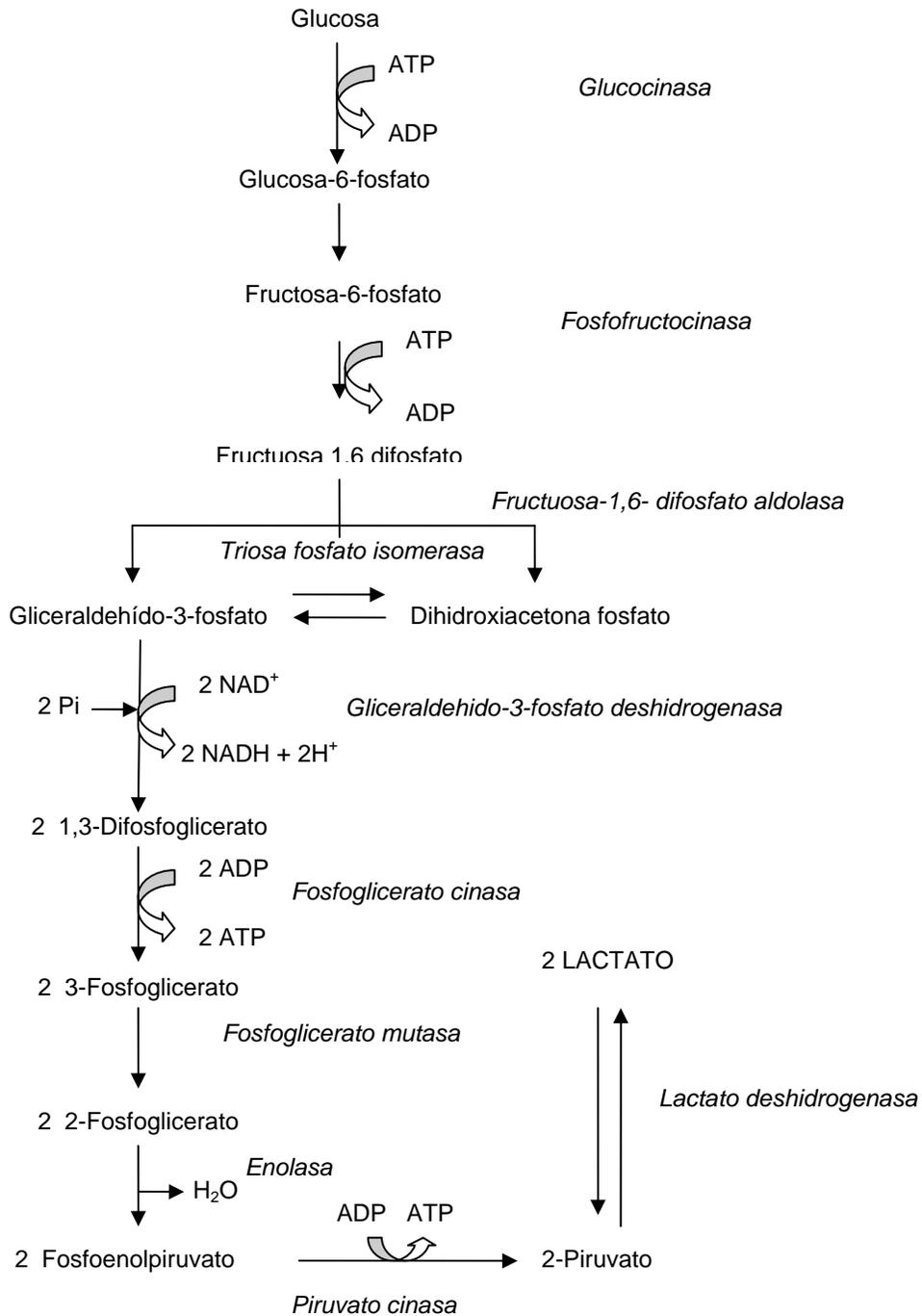


Figura 1. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Adaptada de Axelsson, 1993)

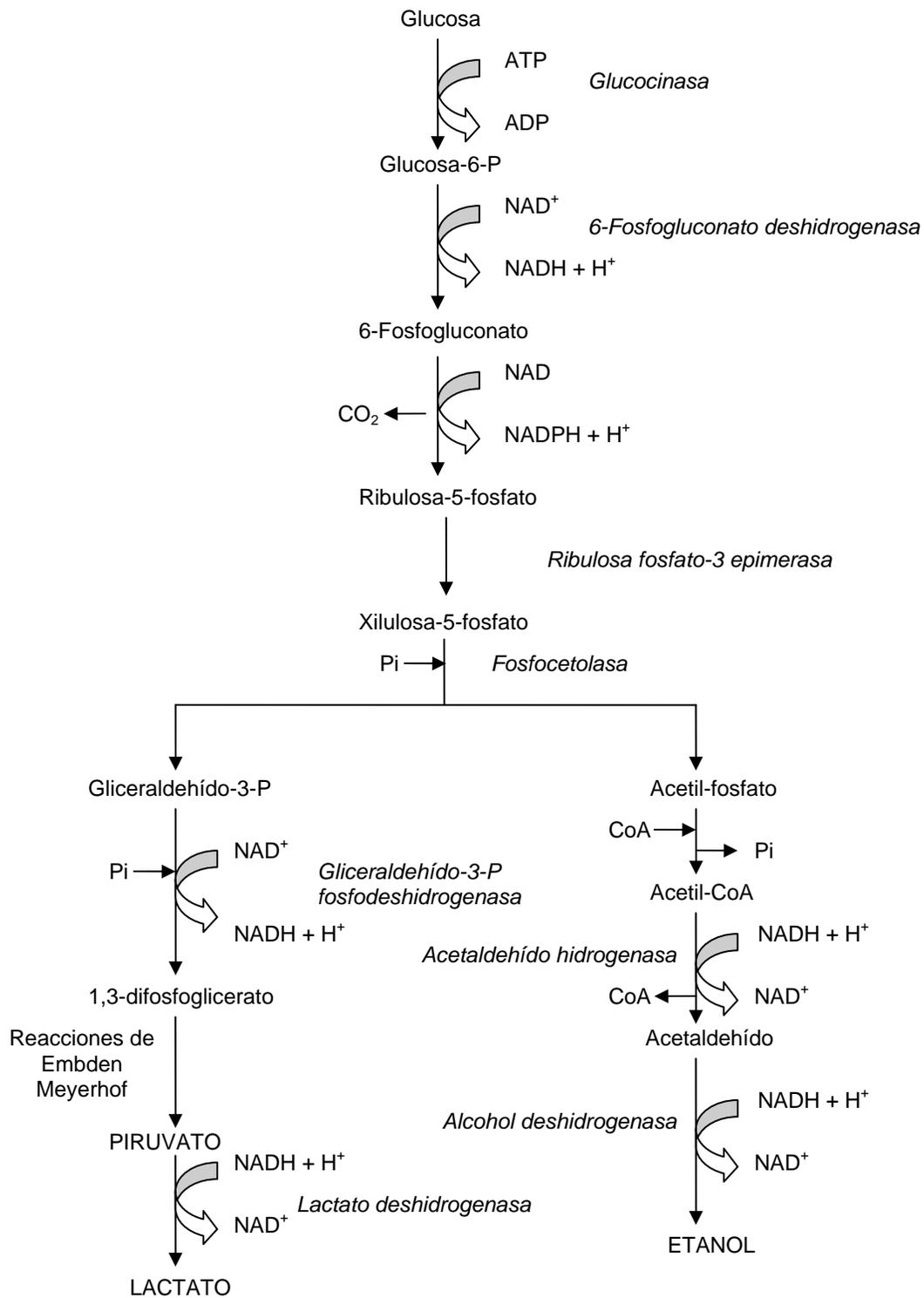


Figura 2. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Adaptada de Axelsson, 1993)

2.1.3. Clasificación y géneros representativos

Al tratarse de un grupo heterogéneo, las BAL están representadas por varios géneros de importancia. Sus células son cocos: es el caso de *Streptococcus*, pero también de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, bacilos: *Lactobacillus*. Se distinguen también por su grupo de fermentación: homoláctica o heteroláctica de acuerdo a lo señalado en la tabla 1. Actualmente se cuentan con técnicas que en base a su composición genética nos permite clasificar a las BAL (Leveau y Bouix, 2000).

Los géneros que se describen brevemente a continuación son los que tienen mayor relevancia en la microbiología de los alimentos (Wood y Holzapfel, 1995).

Lactobacillus. Bacilos o cocobacilos no esporulados, aerotolerantes o anaerobios, acidúricos o acidófilos, con requerimientos nutricionales complejos. Incluyen especies homofermentativas obligadas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas. Alrededor de 50 especies conforman el género. Microerófilos; el desarrollo superficial generalmente mejora ante baja tensión de oxígeno (5-10%). Es común la producción de bacteriocinas.

Ocasionalmente los *Lactobacillus* forman pigmento amarillo, rosa o rojo ladrillo. Los límites de temperatura para desarrollar van de 2 a 53°C con óptima de 30-40°C. Se aíslan fácilmente de productos cárnicos, lácteos y de pescados, aguas, frutas, verduras y ensilados. Son frecuentes en la cavidad oral, contenido intestinal y vagina de mamíferos. Las especies homofermentativas están asociadas con el hombre y animales. Las especies heterofermentativas con los alimentos, en donde llevan a cabo fermentaciones controladas o causan deterioro especialmente bajo refrigeración de productos empacados. Las especies heterofermentativas obligadas son comunes en productos lácteos, cereales y verduras fermentadas y tracto intestinal.

Tabla 1. Bacterias ácido lácticas homofermentativas, heterofermentativas y heterofermentativas facultativas.

Homofermentativas		Heterofermentativas		Heterofermentativas facultativas
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. alimentarius</i> <i>Lb. bulgaricus</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. coryniformis</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. jugurti</i> <i>Lb. jensenii</i> <i>Lb. lactis</i> <i>Lb. leichmannii</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>lactis</i> <i>biovar diacetylactis</i> <i>Lc. lactis</i> subsp <i>cremoris</i> <i>Lc. lactis</i> subsp <i>horniae</i> <i>Lc. garviae</i> <i>Lc. plantarum</i> <i>Lc. raffinolactis</i>	<i>Leuc. cremoris</i> <i>Leuc. dextranicum</i> <i>Leuc. lactis</i> <i>Leuc. mesenteroides</i> <i>Leuc. gelidum</i> <i>Leuc. carnosum</i> <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> subsp. <i>dextranicum</i> <i>Leuc. argentinum</i> <i>Leuc. citreum</i> <i>Leuc. fallax</i> <i>Leuc.</i> <i>pseudomesenteroides</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. cebollobiosus</i> <i>Lb. coprophilus</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. hilgardii</i> <i>Lb. sanfrancisco</i> <i>Lb. trichoides</i> <i>Lb. fructivorans</i> <i>Lb. potis</i>	<i>Lb. acetotolerantes</i> <i>Lb. alimentarius</i> <i>Lb. agilis</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. coryniformis</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. hamsteri</i> <i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. pentosus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. sake</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Weissella</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>P. acidilactici</i> <i>P. cerevisiae</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>P. damnosus</i> <i>P. dextrinicus</i> <i>P. inopinatus</i> <i>P. parvulus</i>	<i>S. boris</i> <i>S. thermophilus</i>	<i>W. confusa</i> <i>W. hellenica</i> <i>W. halotolerans</i> <i>W. kandleri</i> <i>W. minor</i> <i>W. paramesenteroides</i> <i>W. viridescens</i>	<i>C. divergens</i> <i>C. mobile</i> <i>C. gallinarum</i> <i>C. piscicola</i>	<i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>P. damnosus</i> <i>P. dextrinicus</i> <i>P. inopinatus</i>
<i>Tetragenococcus</i>		<i>Oenococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	
<i>T. halophilus</i> <i>T. muriaticus</i>		<i>O. oeni</i>	<i>V. fluviales</i> <i>V. salmoninarum</i>	

Adaptada de Stiles y Holzapfel, 1997; Jay, 2000.

Streptococcus. Cocos de 0.8-1.2 μm , dispuestos en cadenas hasta con más de 50 células o en pares. Anaerobios facultativos. Especies comensales del hombre y animales en mucosas (boca, tractos alimenticio, urinario y respiratorio). Con 39 especies, de las cuales tienen interés las especies *Streptococcus pyogenes*, con intensa actividad beta-hemolítica, como patógeno transmitido por los alimentos a partir de fuentes humanas y *S. agalactiae* de fuentes animales primariamente. La especie *S. thermophilus* es un termófilo, con cepas específicas que se utiliza en la fermentación de productos lácteos, sobre todo en combinación simbiótica con otras BAL. Por ejemplo *Lb. bulgaricus* estimula al estreptococo liberando aminoácidos mientras que este forma compuestos relacionados con el ácido fórmico, que promueven el desarrollo del lactobacilo, lo cual se conoce como protooperación, propiedad aprovechada en la elaboración de yogurt.

Carnobacterium. Este género se origino del *Lactobacillus* cuando se observaron diferencias significativas en cepas aisladas de carnes empacadas. Son bacilos de 0.5-0.7 x 1.1-3.0 μm ; en cultivos viejos se alargan y tienden a perder el Gram, psicrótrofos y de metabolismo predominantemente homofermentativo. Menos rigurosos en sus demandas nutricionales y de intolerancia al oxígeno.

Se aísla de la carne y productos cárnicos, pescado y agua de mar. Producen bacteriocinas. Pueden diferenciarse de *Lactobacillus* por su capacidad de crecimiento a pH de 9.0, no actividad a pH 4.5, ni en agar acetato a pH de 5.4 y no se multiplican a 45°C. Se distinguen seis especies en el género: *C. alterfunditum*, *C. funditum*, *C. mobile*, *C. divergens*, *C. gallinarum* y *C. picicola*, las tres primeras móviles todas pueden desarrollar a 0°C; solo la penúltima fermenta la lactosa y la última débilmente. Otras pruebas bioquímicas y la relación de contenido G + C permiten la diferenciación de todas las especies.

Pediococcus. Cocos de 1.0-2.0 μm , se dividen alternativamente en dos planos perpendiculares dando lugar a la formación de tétradas. Raramente se observan células aisladas. Anaerobio facultativo; cepas inhibidas en presencia de oxígeno. Homofermentativo. Algunas cepas productoras de bacteriocinas. Empleado como cultivo iniciador de salchichas semisecas, deteriorador de cerveza y sidra.

Requieren medios complejos para desarrollarse. No patógeno, pero con actividad descarboxilasa intensa de la que resultan aminas biogénicas. Generalmente es intolerante al oxígeno en el primocultivo.

Lactococcus. Se puede reconocer como la bacteria láctica por excelencia de la leche. Es la BAL más frecuentemente utilizada como cultivo iniciador en la obtención de productos lácteos cultivados, en particular quesos y leches. Consiste en células ovoides que aparecen aisladas, en pares o en cadenas. Algunas cepas forman material gelatinoso que les rodea a manera de cápsula. Recuperables de leche cruda y algunas plantas. No se aíslan de la materia fecal. Homofermentativos. La especie *Lc. piscium* existe en peces. Se comportan como auxótrofos para diversos aminoácidos y son también dependientes de diversas vitaminas.

Leuconostoc. Recuperable de vegetales, productos cárnicos y lácteos, ensilados, vinos y productos fermentados. Requieren medios complejos para desarrollar. Algunas especies son acidotolerantes. Temperatura óptima de 20 a 30°C, pH final en caldo glucosa: 4.4-5.0. Heterofermentadores obligados. Están muy relacionadas con el género *Lactobacillus* cuyas formas cocoides y heterofermentadores pueden confundirse con *Leuconostoc*. Involucrados en el deterioro de alimentos ricos en carbohidratos simples, pero utilizados en forma controlada en la fabricación de algunos quesos debido a la generación de aromas apreciables. Su desarrollo es más lento que otras BAL, las cuales suelen desplazarlo en cultivos mixtos.

Existen otros géneros que también se van usando en el área de alimentos tal vez no con la misma frecuencia que los descritos anteriormente, pero representan una alternativa como los siguientes (Stiles y Holzapfel, 1997).

Vagococcus. Está más relacionado con los géneros *Enterococcus* y *Carnobacterium* además de *Listeria*, que son *Streptococcus* y *Lactococcus*. Los *Streptococcus* aislados de pollo y agua fueron designados como *Vagococcus*

fluviales. Una nueva especie de *V. salmoninarum* fue aislada de peces infectados con *Salmonella*.

Tetragenococcus. Especie incluida en el género *Enterococcus*. Para su crecimiento requiere NaCl a una concentración de 18%. Esta más relacionada con los géneros *Enterococcus* y *Carnobacterium* que con *Lactobacillus*.

Weisella. Es un género nuevo que ha sido creado para incluir a un miembro del género *Leuconostoc* el cual es *Leuc. paramesenteroides*. De igual manera se incluye dentro de este género miembros heterofermentativos del género *Lactobacillus* como *Lb. viridescens* y que ahora fue renombrado como *W. viridescens*.

2.1.4. Métodos de estudio clásicos

Las BAL pueden detectarse en una diversidad de alimentos tanto crudos (frutas, verduras) como procesados (lácteos, cárnicos), madurados o no. Su número es variable en los diferentes alimentos. La mayor parte de los estudios sobre BAL han sido realizados sobre todo con bacterias aisladas de leche o de productos lácteos (Leveau y Bouix, 2000).

La identificación más ampliamente utilizada de las cepas a nivel de género y especie, se basa en las siguientes características fisiológicas y bioquímicas:

- Crecimiento a diferentes temperaturas (10-15 y 45°C)
- Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl (2, 4 y 6.5%)
- Producción de NH₃ a partir de arginina
- Fermentación de carbohidratos (arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, rafinosa, ramnosa, sacarosa, salicina, sorbitol, trehalosa y xilosa)
- Producción de acetoína
- Hidrólisis de esculina
- Sobrevivencia al tratamiento térmico (63 y 65°C)

Para hacer la identificación de aquellas bacterias que se encuentran en poblaciones complejas, han surgido pruebas como los micrométodos que disminuyen costo y tiempo de realización de las mismas (Pereda *et al.*1990).

2.1.5. Importancia de las BAL

La fermentación de varios alimentos por las BAL es una de las formas más antiguas de bioconservación. Las bacterias antagonistas han sido reconocidas por siglos pero en años recientes este fenómeno ha recibido más atención por los investigadores, debido a su potencial utilidad como sustancias naturales en la producción de alimentos para preservar la vida y la seguridad.

Actualmente los consumidores hacen conciencia de su salud, por lo que la dieta juega un rol muy importante en la prevención de las enfermedades y la promoción a la salud. Por consiguiente, hay un incremento en la tendencia por los alimentos que contienen cultivos probióticos (Soomro *et al.* 2004).

Fuller (1992) definió a los probióticos como "aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino".

Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran las BAL, las cepas utilizadas generalmente pertenecen a especies de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Amores *et al.* 2004). Al uso de probióticos se les atribuyen numerosos efectos saludables y son muchos los trabajos que demuestran los beneficios de estos Tabla 2.

Tabla 2. Principales microorganismos probióticos y algunos de sus efectos benéficos para la salud.

Microorganismo	Efecto beneficioso
<i>Lb. acidophilus</i> LC1	Equilibrio de la flora intestinal y efectos en el sistema inmunitario
<i>Lb. acidophilus</i> NCFCO1748	Reducción de la actividad de enzimas procancerígenas, de diarreas y constipación.
<i>Lb. acidophilus</i> NCFM	Reducción de la actividad de enzimas procancerígenas.
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Inmunoestimulador, diarreas e inflamación del intestino.
<i>Lb. bulgaricus</i>	Inmunoestimulador, absorción de lactosa.
<i>Lb. casei</i>	Promotor del crecimiento y de la viabilidad de probióticos.
<i>S. thermophilus</i>	Inmunoestimulador, absorción de lactosa.
<i>B. bifidum</i>	Diarreas por rotavirus, equilibrio de la microbiota.
<i>S. boulardii</i>	Prevención de diarrea y tratamiento de colitis

Tomada de Amores *et al.* 2004

El uso de las BAL en la industria farmacéutica se debe entre otras cosas a las necesidades de las BAL, por lo que algunas cepas son utilizadas en el análisis cuantitativo de aminoácidos y vitaminas en diferentes medicamentos y otros productos (Fernández, 2000).

Sin embargo las BAL también en ocasiones actúan proporcionando efectos indeseables en los alimentos, como consecuencia de su actividad metabólica, observándose algunas alteraciones como la coagulación en la leche, la sobreacidificación de leches fermentadas, coloración indeseable en quesos, enverdecimiento en salchichas y agriado de col, entre otras alteraciones (Fernández, 2000).

2.1.6. Compuestos antimicrobianos producidos por BAL

El alto interés que despierta el estudio y la identificación de las BAL en los alimentos se debe al importante papel que desempeñan en la industria de los

alimentos por su reconocida capacidad fermentativa, así como por sus beneficios para la salud humana.

Actualmente el interés en el estudio de las BAL se debe a su efecto antagonista contra microorganismos patógenos que contaminan a los alimentos, el cual es atribuido a algunas de sus características bioquímicas (Tabla 3).

La mayoría de estas bacterias pueden convertir los carbohidratos en ácidos orgánicos, ácido láctico o ácido acético. El H_2O_2 que es producido por las BAL en condiciones de microaerofilia, el cual puede tener efecto inhibitorio sobre diversos microorganismos así como el diacetilo y el CO_2 , también participan en el efecto antagonista las bacteriocinas de algunas BAL que son punto de interés a considerar para explicar la actividad antagonista de las BAL (Turgay *et al.* 2002).

Otro punto importante que opera es el proceso es la competencia por los nutrientes disponibles en el medio, con notable participación en el efecto antagónico (Meza, 1999).

Tabla 3. Compuestos inhibitorios producidos por BAL y su mecanismo de acción

Componente inhibitorio	Mecanismo de acción
Ácido láctico	Ruptura del metabolismo celular
Peróxido de hidrogeno	Inactivación de biomoléculas esenciales por el anión superóxido de la reacción en cadena, activación del sistema lactoperoxidasa.
Dióxido de carbono	Ambiente anaerobio y/o inhibición de enzima, descarboxilación y/o ruptura de la membrana celular
Diacetilo	Interfiere en la utilización de la arginina
Bacteriocinas	Ruptura de la membrana citoplasmática (en el caso de la nisina)

Adaptada de Turgay *et al.* 2002.

2.1.6.1. Ácidos orgánicos

2.1.6.1.1. Ácido láctico

El ácido láctico es un compuesto incoloro, viscoso y no volátil, su masa molecular es 90.08 y su fórmula $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$. Se da bajo formas óptimamente activas, dextrógira y levógira, frecuentemente denominadas ácido D-Láctico y ácido L-Láctico siendo esta forma la que presenta mayor efecto inhibitorio. Es producido naturalmente durante la fermentación de los alimentos por las BAL, incluyendo los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, y *Carnobacterium* (Juneja y Sofos, 2002).

El ácido láctico es el principal metabolito producido por las BAL, dependiendo del sustrato y del microorganismo, el cual presenta propiedades antimicrobianas. El efecto de inhibición del ácido láctico producido por las BAL ha sido investigado ampliamente. El bajo pH afecta varios aspectos del metabolismo celular, que retarda el crecimiento de microorganismo no deseados en el medio de cultivo (Charumati y Lambert, 1996). El grado de 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 (Ouwehand, 1993).

El ácido láctico es probablemente uno de los agentes antimicrobianos más antiguos, inhibe a *C. botulinum*, *C. perfringes*, *C. sporogenes*, *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *S. aureus* y *Yersinia enterocolitica* (Juneja y Sofos, 2002).

2.1.6.1.2. Ácido acético

El ácido acético, fórmula CH_3COOH , es otro ácido orgánico, producido por las BAL. Ambos ácidos láctico y acético y sus sales son generalmente reconocidos como seguros por la FDA en los Estados Unidos. El ácido acético y sus sales presentan su actividad antimicrobiana a pH 4.5 y el efecto se debe a la disociación de moléculas (Juneja y Sofos, 2002).

En contraste con la mayoría de los ácido orgánicos, el ácido acético es generalmente más efectivo contra levaduras y bacterias. Las bacterias que inhibe

incluye a los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella*.

Juneja y Sofos (2002) reportan que una concentración de ácido acético al 0.1% es bacteriostático para *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* y *Aeromonas hydrophila*, no se mostró el mismo efecto con cepas de *B. cereus* y *S. aureus* a la concentración antes mencionada.

2.1.6.2. Bacteriocinas

De todos los compuestos inhibitorios producidos por las BAL, se ha puesto especial interés en las bacteriocinas, las cuales son objeto de investigación por su actividad antimicrobiana contra las bacterias de los alimentos tales como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Clostridium botulinum* entre otros (Davidson y Hoover, 1993).

2.1.6.2.1 Definición

Las bacteriocinas son identificadas como proteínas biológicamente activas contra miembros de su misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora (Klaenhammer, 1988).

Se denominan bacteriocinas a las moléculas que responden a los cinco criterios siguientes (Beliard y Thuault, 1988):

- Tiene un espectro de acción limitado; sólo las especies taxonómicamente próximas a la cepa productora pueden ser inhibidas. Sin embargo, recientemente este concepto se ha modificado ya que se ha demostrado también el efecto bactericida contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora.
- Poseen una pared proteica necesaria para su actividad
- Son bactericidas
- Para actuar la bacteriocina se fija sobre un receptor específico localizado sobre sitios “blanco”

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

Dentro de las bacteriocinas, se encuentra la nisina, aislada, caracterizada y denominada por Mattick y Hirsch en 1947 producida por especies de *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos inhibiendo el desarrollo de bacterias Gram positivas especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria*. Siendo la nisina la única bacteriocina reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Davidson y Hoover, 1993).

Una ventaja importante de las bacteriocinas sobre los antibióticos clásicos es que las enzimas digestivas las destruyen. Este hecho indica que la ingesta de estos compuestos no alterará la ecología del tracto digestivo y tampoco esto causará riesgos relacionados al uso de antibióticos comunes (Bromberg *et al.* 2004).

2.1.6.2.2. Clasificación

Diversos investigadores han buscado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genética. Algunos ejemplos de bacteriocinas se mencionan en la tabla 4. La clasificación de estos compuestos propuesta por Ness en 1996 en base en las características bioquímicas y genéticas (González *et al.* 2003).

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

Tabla 4. Bacteriocinas y microorganismos productores

Bacteriocina	Clase	Microorganismo productor
Nisina	I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Pediocina PA-1	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE92
Pediocina JD	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> JD1-23
Sakacina A	IIa	<i>Lactobacillus sake</i> 706
Sakacina P	IIa	<i>Lactobacillus sake</i> LTH673
Curvacina A	IIa	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174
Mesentericina Y105	IIa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Plantaricina E/F	IIb	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11
Lactococcina A	IIb	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Lactococcina B	IIb	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4
Lactacina F	IIb	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Divergicina	IIc	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13
Helveticina	III	<i>Lactobacillus helveticus</i>

Tomada de González *et al.* 2003.

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

- Clase IIa.- Son péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.
- Clase IIb.- Son formadores de complejos de poración que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.
- Clase IIc.- Son péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

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

2.1.6.2.3. Mecanismo de acción

Las bacteriocinas producidas por las BAL tienen sitios “blanco” en los microorganismos sensibles (Tabla 5). El modo de acción de las bacteriocinas es complejo. La nisina pertenece a la clase I y la pediocina como representante de la clase II, son las más estudiadas en este concepto y comparten algunas características en común. Al parecer, 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 depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos que resultan en la formación de poros con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza motriz de protones (FMP), salida de ATP y aminoácidos. La fuerza motriz de protones juega un papel central en la síntesis de ATP, en el transporte activo y el movimiento bacteriano, por lo tanto, se inhibe la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular (Charumati y Lember, 1996).

Aunque es común la formación de poros y la disipación de la fuerza motriz de protones en el modo de acción de las bacteriocinas, existen algunas particularidades en cada clase. De la clase I, la nisina no requiere de un receptor unido a la membrana de la célula “blanco” ya que reconoce la composición fosfolipídica de la célula. En cambio, para la acción de la lactococina A y la lactoestrepcina se requiere de la unión a receptores membranales. Para las bacteriocinas de la clase IIa se ha sugerido que la región amino terminal tiene un papel importante en la capacidad de reconocimiento de la membrana de la célula “blanco”. En las de la clase IIb, las plantaricinas EF y JK dependen de la acción de dos péptidos para la formación de poros y consecuente disipación del potencial de membrana (González *et al.* 2003).

Tabla 5. Bacteriocinas producidas por BAL y microorganismos sensibles

Organismo productor	Bacteriocina	Microorganismos sensibles
<i>Lactococcus cremoris</i>	Lactoestrepina 5	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	Lactacina Lactacina B	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>S. epidemidis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus faecalis</i> <i>Salmonella enteritidis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Lactobacilli</i>
<i>Lactobacillus sp.</i>	Sin nombre	<i>Clostridium</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium sporogenes</i>
<i>Lb. saké</i>	Sakacina A	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Lb. bulgaricus</i>	Bulgaricina	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Lactococcus lactis</i>
<i>Lc. lactis</i>	Nisina	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium botulinum</i>
<i>P. acidolactici</i>	Pediocina Ach Pediocina PA-1	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium perfringes</i> <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>P. pentosaceus</i>	Pediocina A	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Listeria monocytogenes</i>

Tomada de Wood y Holzapel, 1995.

2.1.6.3. Otros compuestos

El **peróxido de hidrógeno** es uno de los compuestos con actividad antimicrobiana, que pudieran estar produciendo las BAL. Sin embargo, la presencia de este metabolito no es deseable en algunos alimentos debido a que es una sustancia oxidante que puede ocasionar decoloraciones, sabores desagradables o degradación de nutrientes. Muchas bacterias fermentadoras producen peróxido de hidrógeno como un mecanismo protector contra el oxígeno. El peróxido de hidrógeno producido por las BAL es inhibidor de bacterias, Gram

negativas como *Pseudomonas spp* y Gram positivas como *S. aureus* (Charumati y Lambert, 1996).

El H_2O_2 aumenta en el medio circulante mientras se tengan condiciones anaerobias. El efecto letal del H_2O_2 puede deberse a la inactivación de biomoléculas esenciales por el ion superóxido de la reacción en cadena. También puede funcionar por la vía del sistema de la lactoperoxidasa-tiocianato. El H_2O_2 oxida el tiocianato para producir compuestos tóxicos de la oxidación, productos que son letales para los patógenos de los alimentos. El H_2O_2 es más efectivo como esporicida que bactericida (Charumati y Lambert, 1996).

Lactobacillus (algunas especies), *Lactococcus lactis* y *Leuconostoc cremoris* pueden producir H_2O_2 cuando se transfieren de condiciones anaerobias a aerobias. Se ha demostrado que este metabolito inhibe el crecimiento de *S. aureus*, varios microorganismos psicrótrofos y *Pseudomonas spp* (González y Zamudio, 2004).

El **dióxido de carbono** puede ejercer efecto antimicrobiano de varias maneras en un medio ambiente más anaeróbico por inhibición enzimática, descarboxilación y por ruptura de la membrana celular con acumulación de gases en la fase de la bicapa lipídica (Charumati y Lambert, 1996).

El **diacetilo** (2,3 butanodiol) es sintetizado por ciertas especies de BAL a partir del piruvato. Este inhibe el crecimiento de diversas bacterias Gram negativas, Gram positivas y levaduras. Produce el sabor a mantequilla en productos fermentados y en algunos alimentos es usado como aditivo. El diacetilo interfiere con la utilización de la arginina por reacción con la arginina ligada a proteínas de organismos Gram negativos (Charumati y Lambert, 1996).

Jay (2000) reportó que 200 $\mu\text{g/mL}$ de diacetilo inhiben levaduras y bacterias Gram negativas y 300 $\mu\text{g/mL}$ inhiben bacterias Gram positivas. Motlagh *et al.* (1991) estudiaron el diacetilo a 344 $\mu\text{g/mL}$ contra *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L.*

innocua, *S. anatum*, *S. typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* y *Aeromonas hydrophila*. El diacetilo solo fue efectivo contra bacterias Gram negativas mostrando una disminución de células viables después de 24 h de incubación a 4°C. El diacetilo juega un rol importante en la preservación natural de los alimentos.

Ácidos grasos. Algunos *Lactobacillus* y *Lactococcus* muestran actividad lipolítica y bajo ciertas condiciones producen concentraciones significativas de ácidos grasos, los cuales muestran actividad antimicrobiana. En muchos casos los ácidos grasos mejoran las características sensoriales de los alimentos fermentado (Wood y Holzapfel, 1995).

2.2. Productos fermentados

Numerosos productos alimenticios deben su producción y características a la actividad fermentativa de microorganismos como las BAL. Algunos alimentos como los quesos fermentados, los encurtidos, la col agria y los embutidos fermentados, son productos conservados cuya durabilidad se prolonga considerablemente con respecto a la de las materias primas de las cuales están hechos. Además de hacerlos más durables, todos los alimentos fermentados tienen un aroma y un sabor característico que resulta directa o indirectamente de los organismos fermentadores (Jay, 2000).

2.2.1. Leches fermentadas

Las leches fermentadas pueden dividirse, dependiendo del metabolismo de la microbiota, en tres grupos: fermentaciones lácticas, de levaduras-lácticas y de mohos-láctica. El primer grupo puede subdividirse, de acuerdo con las características de la microbiota láctica, en fermentaciones mesófilas y termófilas; en este grupo se incluyen también los productos terapéuticos. Todos los productos resultan de la transformación de la lactosa en ácido láctico principalmente que confiere el típico sabor de leche fermentada. La identidad de los diferentes productos se debe al metabolismo de los microorganismos fermentadores y a los componentes del sabor y aroma que se generan. Entre ellos, los más típicos,

resultantes del metabolismo de la lactosa y del nitrógeno, son acetato, acetaldehído, lactato, ácidos grasos, péptidos, etanol, CO₂ y diacetilo (Roberts *et al.* 2001).

2.2.2. Quesos

Una de las ramas de la industria láctea que depende en gran manera de la actividad de los microorganismos, es la industria de los quesos. De acuerdo a la FAO/OMS el queso se define como “producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación de suero de la leche, nata, leche parcialmente desnatada, mazada o por una mezcla de estos productos”. Una gran variedad de ellos han sido elaborados bajo la actividad enzimática de diversas especies bacterianas y fúngicas. En la elaboración de mantequillas también se utilizan cultivos bacterianos seleccionados por su habilidad de producir ácido y sabor (Veisseyre, 1990).

Los quesos pueden elaborarse con leche entera, parcialmente descremada, semidescremada, descremada, crema o doble crema y su clasificación es la siguiente de acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994:

Fresco. Se caracteriza por su elevado contenido de humedad, sabor suave y un periodo de vida de anaquel corto, por lo que debe estar refrigerado. Se consideran como quesos frescos: canasto, panela, fresco, rancharo, sierra, blanco, enchilado, adobado, oaxaca, asadero, mozzarella, morral, adobera, cottage, crema, doble crema, petit suisse, etc.

Madurado. Estos son los quesos de pasta más dura, semidura o blanda, sometidos a un proceso de maduración mediante la adición de microorganismos, mohos o bacterias bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos, que les confieren la consistencia y el sabor característicos. Aquí se encuentran los quesos: cheddar, chester, chihuahua, manchego, brick, edam, gouda, gruyere, emmental, cheshire,

holandés, amsterdam, butterkase, cabrales, camembert, roquefort y danablu, entre otros.

Procesado. Resultado de la mezcla de quesos madurados fundidos, a los que se les pueden agregar ingredientes y especias; dentro de esta clasificación están los quesos fundidos y para untar, como el queso amarillo y la mayoría de los que se venden en rebanadas cuadradas

En el medio industrial, las BAL deben estar adaptadas al medio de la leche, es decir, ser capaces de utilizar la lactosa y las fuentes de nitrógeno de la leche. Las actividades ligadas al crecimiento bacteriano en este medio son el origen de las transformaciones que afectan a la leche, a la cuajada y a los productos lácteos y queseros que resultan de ellas (Leveau y Bouix, 2000).

En nuestro país se producen algunas variedades de quesos que no son comunes en los países industrializados. Existen escasas referencias sobre su microbiología y participación como vehículos de agentes patógenos. Pueden mencionarse: el panela, el requesón, el Oaxaca, el cotija y el Chihuahua. Los dos últimos son madurados pero a partir de su flora natural y con un pobre control del proceso. La producción en pequeña escala por lo general se emplea leche cruda. Con frecuencia, en este último caso se comercializa sin empaque por lo que el riesgo a la contaminación es inminente (Fernández, 2000).

Diversos factores influyen en la presencia y supervivencia de patógenos en el queso: características del patógeno, como su tolerancia al calor, ácido y sal, número inicial presente y su estado fisiológico que influye en la capacidad de sobrevivir de los patógenos. Entre los parámetros que adquieren importancia cabe destacar la temperatura de almacenamiento y procesado, la producción de ácido por los cultivos iniciadores, la adición de sal y otros inhibidores y el proceso de maduración (Roberts *et al.* 2001).

2.3. Microorganismos patógenos y/o deterioradores de importancia en los alimentos

La calidad sanitaria de los alimentos queda configurada por una serie de atributos (Tabla 6) que pueden y deben procurarse desde su generación en donde quiera que esta ocurra hasta su servicio y consumo

Tabla 6. Atributos que debe presentar un alimento

Alimento de buena calidad	
Nutritivo	Idóneo
Sensorialmente aceptable	Inocuo
Fresco	Larga vida de anaquel

Tomada de Fernández, 2000

El deterioro de los alimentos es desde luego, la expresión de procesos físicos y reacciones químicas que suceden durante el almacenamiento y que llevan a la pérdida de su valor comercial. Sin embargo, considérese que este hecho es detectable por el consumidor frente al alimento y de esa manera se podría evitar su consumo.

Los microorganismos de interés sanitario en los alimentos incluyen de manera convencional, bacterias, hongos, levaduras, protozoarios, virus parásitos microscópicos o sus estados de huevecillo o larvario, y ciertas algas microscópicas. Se encuentran involucrados en dos áreas fundamentales de la microbiología sanitaria: como causa de deterioro de los alimentos y como agentes etiológicos de enfermedades asociadas a su consumo. Deben considerarse además, en menor escala, su participación en la generación controlada de cambios sensoriales y el empleo, directo o indirecto, en la preservación de su frescura e inocuidad. Estos dos últimos efectos se asocian principalmente a la actividad de las BAL (Fernández, 2000).

La presencia de agentes patógenos no suele acompañarse de cambios sensoriales objetables y el alimento se ingeriría sin resistencia. Los riesgos que

representan una amenaza a la salud son los de naturaleza microbiana originando daño en el tracto digestivo además de que otras localidades pueden verse comprometidas (Fernández, 2000).

Las infecciones y las toxiinfecciones causadas por patógenos transmitidos a través de los alimentos han sido reconocidas por cerca de 100 años; ya para 1950 los principales patógenos que preocupaban eran *Salmonella*, *S. aureus* y *Clostridium perfringens* en el Reino Unido y en Estados Unidos. El botulismo también se conocía como peligroso pero era raro enfermarse con alimentos enlatados. Sin embargo, por 1980 se comenzaron a involucrar otros agentes como *Campylobacter*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7, pero tuvieron que pasar varios años para que autoridades de salud reconocieran que causaban serias complicaciones o la muerte y que estos podían transmitirse por el consumo de alimentos y por un limitado control en el proceso (Tood, 2001).

En México, el registro de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) no es completo, por ejemplo, la Secretaría de Salud en México, señalaba que hasta 1976 las enfermedades transmitidas por los alimentos ocupaban el primer lugar como causa de enfermedad; a partir de 1977 ocupan el segundo lugar. El grupo de edad más afectado es el de menores de un año. La tendencia de 1961 a 1989 se muestra ascendente, con un incremento de la tasa de 172% (Torres, 2002). El sistema de notificación de casos a mejorado pero esto no garantiza la calidad en los alimentos.

Para 1986, las ETA contribuyeron con 7.6% de la mortalidad total del país, actualmente no figuran entre las primeras diez. Sin embargo, en los últimos 10 años se han registrado 363 brotes, la mitad de ellos por intoxicación alimentaria, le siguen en frecuencia la fiebre tifoidea, hepatitis y salmonelosis. Estos brotes afectaron a 14,412 personas y se notificaron 249 defunciones. Los alimentos reportados son muy variados y resaltan por su alto consumo el queso, la leche, el pastel, el pollo y la carne de res (Torres, 2002).

A finales del siglo XX se produce un gran desarrollo de la microbiología de los alimentos, el comienzo de una nueva era de la química e ingeniería alimentaria, el desarrollo de sistemas de irradiación de los alimentos, la introducción de nuevos conceptos como el análisis de riesgos y puntos críticos de control (HACCP) el desarrollo de técnicas genéticas o moleculares aplicadas al estudio de los patógenos alimentarios, se desarrollan alimentos con potencial bactericida contra patógenos, etc. (Torres, 2002).

De los 79 brotes que ocurrieron en 1980-1989, se confirmaron 58 brotes de infecciones e intoxicaciones microbianas y parasitarias transmitidas por alimentos, que se presentaron en el Distrito Federal y 16 estados de la república. Los brotes se presentaron, en su mayoría, después de una fiesta o reunión social (24%), en escuelas o guarderías (10%), restaurantes (9%) y hospitales (9%). Los quesos y otros derivados lácteos estuvieron involucrados en el 29% de los brotes, seguidos por pasteles (16%), leche (14%) y productos de cerdo (9%). Estas cifras son solo de los casos notificados, ya que en nuestro país el registro de las ETA no es completo (Fernández, 2000).

2.3.1. *Vibrio*

Los microorganismos pertenecientes al género *Vibrio* son bacilos cortos Gram negativos que miden de 0.5 a 0.8 μm de diámetro por 1.4 a 2.6 μm de largo, levemente curvados o enrollados en forma de coma. Son catalasa negativa y oxidasa positiva, anaerobios facultativos y realizan metabolismo tanto fermentativo como respiratorio. El cloruro de sodio estimula el crecimiento de todas las especies y para algunas es una necesidad estricta. Los vibrios enteropatógenos crecen óptimamente en torno a los 37°C. El cólera es considerado principalmente una infección transmitida por los alimentos, con frecuencia el alimento que ha estado en contacto con agua contaminada puede constituir el vehículo de la infección (Adams y Moss, 1997).

V. parahaemolyticus fué descubierto y aislado durante un brote de gastroenteritis por consumo de pescado y ocupó la atención de las autoridades en Japón a partir de 1958, cuando se presentaron en la población numerosos brotes semejantes. Constituye entre ellos la principal causa de gastroenteritis, aunque se tienen registrados brotes en otras partes del mundo (Dalsgaard, 1998). Diversas especies de *Vibrio* son patógenas para el hombre (Tabla 7).

Tabla 7. Especies de *Vibrio* spp. que causan o están asociados con infecciones en humanos.

	Aparición en muestras clínicas humanas*	
	Intestinal	No intestinal
<i>V. cholerae</i> O1	++++	+
<i>V. cholerae</i> NO-O1	++	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	++++	+
<i>V. fluviales</i>	++	-
<i>V. frunci</i>	++	-
<i>V. hollisae</i>	++	-
<i>V. mimicus</i>	++	+
<i>V. metschnikovii</i>	+	+
<i>V. vulnificus</i>	+	+++
<i>V. alginolyticus</i>	-	++
<i>V. carchariae</i>	-	+
<i>V. cincinnatiensis</i>	-	+
<i>V. damsela</i>	-	+

* El símbolo (+) hace referencia a la frecuencia relativa de cada microorganismo en muestras clínicas y (-) indica ausencia del microorganismo.

Tomada de Dalsgaard, 1998

2.3.2. *Shigella*

El género *Shigella* (de Shiga, bacteriólogo japonés) incluye bacterias con una manifiesta adaptación exclusiva al hombre y primates superiores. Este género fue identificado como causante de diarrea en humanos a finales del siglo XIX, son bacilos Gram negativos, inmóviles, anaerobios facultativos, no fermentan la lactosa y son catalasa positivos, con excepción de un serovar de *S. dysenteriae*.

Son altamente infectivas y con facilidad se transmiten de persona a persona; en la actualidad se conocen incidentes en los que la transmisión se llevo a cabo a través del agua y los alimentos (Fernández, 2000). Se clasifican como se indica en la tabla 8.

Tabla 8. Clasificación de las especies del género *Shigella*.

Subgrupo	Especie	Serotipos
A	<i>S. dysenteriae</i>	12
B	<i>S. flexneri</i>	13
C	<i>S. boydii</i>	18
D	<i>S. sonnei</i>	1

Adaptada de Torres, 2002

La shigelosis es una enfermedad endémica de distribución mundial, este padecimiento está asociado con la pobre higiene de las comunidades donde se disemina su agente causal. En países desarrollados donde existen programas bien establecidos de vigilancia y control sanitario, también se ha reportado en los últimos años. Se estima que ocurren 576,000 muertes anualmente entre niños menores de cinco años de edad debido a este padecimiento; dato que sin duda revela la trascendencia de este microorganismo como agente causal de ETA (Torres, 2002).

Se ha reportado que *S. sonnei* y *S. flexneri*, sobreviven a 25 °C en harina y leche entera por más de 170 días. Estas mismas cepas, en huevos, almejas y camarones, sobreviven durante periodos de 50 días; en ostras durante 30 días y en huevos blancos por 20 días. *Shigella* puede sobrevivir en agua por 120 días (Torres, 2002).

Aunque siempre se ha considerado que las bacterias del género *Shigella* son microorganismos particularmente delicados y poco resistentes a las condiciones ambientales, lo cierto es que pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en distintas condiciones (Torres, 2002):

- A temperatura ambiente en heces, vegetales y frutas contaminadas.
- A temperaturas inferiores a -20 °C en alimentos.
- A temperatura de refrigeración en alimentos.
- A 80 °C durante varios segundos.
- En alimentos con pH neutro, inoculados con *Shigella* se ha recuperado este microorganismo pasados 100 días cuando se han mantenido a -20°C y 4°C.
- Sobrevivieron más de 50 días al ser inoculados en huevos, leche, marisco y harina.
- En queso contaminado sobreviven por varias semanas.

El tipo de alimentos implicados con más frecuencia en la aparición de brotes de shigelosis son: ensaladas de todo tipo (papas cocidas, pollo, atún, marisco, lechuga), ostras crudas, frutas (fresa), hamburguesas, leche, leche ácida, queso, pescado, marisco, arroz cocido, sandwiches, etc. En todos los casos la contaminación se produce en alimentos preparados, listos para el consumo, mal manipulados por portadores de *Shigella* en sus heces, asintomáticos o enfermos (Torres, 2002).

La principal puerta de entrada del patógeno al organismo es la vía fecal-oral, aunque también pueden ocurrir brotes debido a alimentos y agua contaminados. La dosis infectante es pequeña ya que bastan 10 células para que se presente la enfermedad (Torres, 2002).

2.3.3. *Salmonella*

El género *Salmonella* es uno de los más extensamente estudiado entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos. Típico bacilo Gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*, generalmente son móviles, aerobios o facultativos anaerobios (Fernández, 2000).

En la actualidad existen alrededor de 2300 serovares, todos considerados potencialmente patógenos al humano, sólo 200 son asociados con enfermedad

humana. El hábitat natural de *Salmonella* es el tracto intestinal de humanos y animales de abasto, animales salvajes, roedores, animales de compañía, aves, reptiles e insectos, habitualmente sin presentar ninguna enfermedad manifiesta.

El humano no representa más que un eslabón en la cadena contaminante. Los animales domésticos o salvajes constituyen un inmenso reservorio a partir del cual las salmonelas pueden difundirse al ambiente y en especial al agua y alimentos. Pueden ser diseminados por medio de las heces al suelo, al agua, a las personas, a los alimentos y piensos y desde estos medios a otros animales (Torres, 2002).

En un estudio a partir de requesón, que es un subproducto obtenido durante la fabricación del queso, el cual se ofrece a granel al público después de 12 a 18 h de haber sido elaborado, de 198 muestras de requesón procedentes de expendios de mercados públicos de Guadalajara, el 26.7% resultaron positivos a *Salmonella* (Fernández, 2000).

En otro estudio realizado con requesón la incidencia de *Salmonella* fue de 18%, esta cifra de *Salmonella* es una clara evidencia de la insalubridad con la que se maneja el producto desde su obtención hasta su venta (Torres, 2002).

Aunque en los análisis realizados en quesos fabricados comercialmente rara vez se han aislados salmonelas, esta bacteria puede multiplicarse durante la fabricación y sobrevivir en diversas variedades durante más de 60 días. Diversos brotes de salmonelosis debidos al consumo de quesos contaminados han sido atribuidos a una falta de control durante el proceso de elaboración o a la utilización de leche cruda contaminada (Roberts *et al.* 2001).

En cuanto a frecuencia con relación a los meses del año ésta se intensifica a partir de los meses de abril y mayo alcanzando un pico en julio, con una disminución en septiembre y octubre. Los estados más afectados han sido Tabasco, Coahuila, Chiapas y Quintana Roo. De las salmonelas aisladas de alimentos, 51% correspondió a alimentos preparados, 23% a cárnicos (productos derivados de la carne como: jamón, longaniza, chorizo, queso de puerco, etc.), 22% a carne

(molida de res, pollo, pescado), 3% a lácteos y 1% a huevo fresco y en polvo (Fernández, 2000).

2.3.4. *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram negativo, aerobio facultativo, fermenta la lactosa, incapaz de desarrollarse a temperaturas superiores a 42° y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Este microorganismo es propio del contenido intestinal por lo que es una bacteria indicadora de contaminación fecal en los alimentos (Fernández, 2000).

Este microorganismo puede ser el agente causante de gastroenteritis humana y de otros animales. Las cepas patógenas que causan diarrea se transmiten de manera directa o a través de los alimentos y causan distintos síndromes clínicos; las heces de animales de sangre caliente, el agua no tratada y los portadores infectados suelen ser la fuente de contaminación más común en los alimentos. *E. coli* patógena asociada al consumo de alimentos se agrupa en cinco categorías: *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroadherente y *E. coli* enteroagregativa, que se distinguen entre sí por sus propiedades de virulencia, las interacciones que establecen con la mucosa intestinal, los síndromes clínicos que originan, así como por las diferencias epidemiológicas y de serogrupos O:H que presentan (Torres, 2002).

En general *E. coli* no crece bien durante el proceso de elaboración del queso. El bajo pH y la sal son inhibidores pero si el cultivo iniciador no tiene la actividad adecuada, *E. coli* puede multiplicarse y sobrevivir al proceso de elaboración de este producto (Roberts *et al.* 2001).

La contaminación con *E. coli* se puede dar a partir de la contaminación de la leche, esta bacteria eventualmente existe en residuos de suciedad sobre el equipo mal saneado que contiene la leche ya tratada térmicamente. Aún puede multiplicarse si el nivel de humedad se lo permite. Con todo, *E. coli* es el indicador más

confiable de contaminación fecal en alimentos, especialmente en aquellos que han recibido algún tratamiento antimicrobiano severo (Fernández, 2000).

2.3.5. *Listeria*

Es un bacilo corto Gram positivo, de 0.4-0.5 μm de diámetro y 0.5-2.0 μm de longitud, con extremos redondeados, algunas células pueden ser curvadas. *L. monocytogenes* representa una nueva generación de patógenos “resistentes” transmitidos por los alimentos. En comparación con otros gérmenes, es relativamente más tolerante a la acidez, sal, calor, agentes oxidantes, alcohol y aditivos empleados en alimentos. Además, se adapta en forma rápida y efectiva al ambiente y estrés debido al procesamiento, lo cual hace que represente una amenaza en alimentos mínimamente procesados y sin tratamiento térmico. Una razón para preocuparse con respecto a esta bacteria en alimentos es su capacidad como psicrótrofo y mesófilo (Torres, 2002).

Descubierta hace poco más de 100 años, *L. monocytogenes* se implicó como agente etiológico en las enfermedades transmitidas por alimentos a partir de los años 1980. Previo a esta fecha, se conocían casos de listeriosis, incluso letales, pero al germen se le considera más bien un patógeno oportunista especialmente entre personas hipersensibles (Fernández, 2000).

Si *Listeria* está presente en leche líquida y sus subproductos conservados en refrigeración, tiene potencial para crecer, aunque a una velocidad relativamente lenta. No obstante, estos productos frescos no son almacenados por periodos prolongados en refrigeración antes de ser consumidos. Por lo tanto, si *Listeria* se encuentra en el alimento, el inóculo puede ser un número bajo debido al tiempo necesario para alcanzar niveles mayores de microorganismos. Por otra parte *L. monocytogenes* ha sido aislada de una variedad de alimentos congelados, entre los que se incluyen productos lácteos, carnes y mariscos. *L. monocytogenes* ha alertado a las autoridades sanitarias por la gravedad con que se presenta el cuadro de la enfermedad, que en un 30% de los casos causan la muerte del

individuo y donde en la mayoría de los casos el alimento involucrado ha sido de origen lácteo (Torres, 2002).

En 1985, el consumo de queso estilo mexicano contaminado fue el causante de un brote de listeriosis en California. El equipo y el entorno de la fábrica presentaban una gran contaminación con *L. monocytogenes*. La mayor incidencia de *L. monocytogenes* en quesos blancos y en los madurados por mohos que en quesos duros ha sido confirmada en estudios posteriores en Estados Unidos, Francia, Italia, Dinamarca, Chipre, España, Suiza y Alemania occidental (Roberts *et al.* 2001).

Schöbitz *et al.* (2001) determinaron la presencia de *L. monocytogenes* en leche recepcionada en plantas lecheras y la contaminación de quesos frescos artesanales con esta bacteria. Los resultados de los análisis bacteriológicos indicaron que, de las 50 muestras de leche cruda, 22% fueron positivas a la presencia de *L. monocytogenes*. Esta cifra es significativa ya que si tomamos en cuenta en el estado de Hidalgo la mayoría de los quesos se producen de forma artesanal y la forma de almacenamiento no es la correcta, es probable que esta bacteria ocasione un problema de salud.

2.3.6. *Bacillus*, *Enterobacter*, *Proteus* y *Klebsiella*.

Bacillus subtilis son bacilos Gram positivos esporógenos y aerobios. Si bien la mayoría son mesófilos, los hay psicrótrofos y termófilos (Jay, 2000).

Las empanadas y pasteles de carne son vehículos de los bacilos causantes de intoxicaciones alimentarias, junto con una serie de carnes tratadas y de platos a base de carne y de arroz. Productos horneados tales como el pan y los bollos blandos han sido implicados en varios brotes de intoxicación alimentaria por *B. subtilis*. Si bien *B. subtilis* es responsable del efecto conocido como pan viscoso en el que las esporas resisten la cocción, degradan la estructura interna de la hogaza y producen una mucosidad pegajosa (Adams y Moss, 1997).

El rendimiento de quesos disminuye ante un desarrollo de activo de bacterias psicrótrofas específicamente *Bacillus* con capacidad proteolítica y lipolítica. El origen de la alteración generalmente se encuentra en la leche utilizada como materia prima. Este efecto es la consecuencia de la degradación de proteínas o lípidos, la cual llega a ser de hasta 45 y 55% de la pérdida de la materia seca respectivamente (Adams y Moss, 1997).

El género *Enterobacter* está conformado por bacterias entéricas Gram negativas, no esporuladas, catalasa positiva y fermentativas, propios del contenido intestinal, capaces de sobrevivir en el medio ambiente y multiplicarse en los alimentos, Indicadores de manipulación higiénica deficiente en los alimentos (Fernández, 2000).

Las bacterias que pertenecen al género *Proteus* son bacilos entéricos Gram negativos, aerobios que presentan pleoformismo; de aquí su nombre genérico. Todos ellos son móviles y típicamente crecen en forma de oleadas en la superficie de las placas de agar húmedas. Son enterobacterias típicas que se hallan presentes en el tracto gastrointestinal del hombre y de los animales, se pueden aislar en diversas hortalizas y en productos cárnicos en especial en aquellos que se alteran a temperatura de mesófilos. A las bacterias de este género se les ha atribuido la producción de alteraciones, en las carnes, pescado, mariscos y en huevo (Jay, 2000).

Klebsiella es una bacteria Gram negativa, cuyo hábitat natural es el tracto gastrointestinal del hombre y de los animales. Produce una proporción pequeña (cerca de 3%) de las neumonías bacterianas. En ocasiones es causante de infecciones de las vías urinarias y bacteriemia con lesiones focales en los pacientes debilitados. Se ha comprobado que *Klebsiella pneumoniae* produce enterotoxinas termoestables. Las toxinas termoestables de este microorganismo son similares a la toxina de *E. coli* (Jay, 2000).

2.4. Microorganismos patógenos de importancia en quesos

La magnitud del riesgo a la salud por consumo de quesos no es la misma para todas las variedades. El empleo de leche cruda, la ausencia de maduración, las condiciones en las que se lleva a cabo el uso de empaques, y las condiciones sanitarias de manejo del producto antes del empaque y durante su comercialización, son factores contribuyentes. Los quesos son vehículos potenciales de una gran diversidad de agentes patógenos. Aunque no se reportan con frecuencia, en la literatura existen reportes de brotes causados por tales agentes. Los brotes más frecuentes tienen como agente etiológico a *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Brucella spp.* y *L. monocytogenes* (Fernández., 2000).

Los agentes microbianos patógenos en los quesos fueron agrupados de la siguiente manera y basándose en datos epidemiológicos, incidencia en leche y características individuales de los microorganismos.

1. Microorganismos de alto riesgo, *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 (Tabla 9).

Tabla 9. Persistencia de *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 durante la elaboración de queso Oaxaca.

Etapa	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
Leche pasteurizada	4.0 ¹	3.4	4.1
Suero	2.7	2.7	2.9
Cuajada	4.3	4.4	4.6
Producto final	3.5	3.6	3.8

¹ media del log₁₀ ufc/mL o g

Tomada de Fernández, 2000

2. Los de riesgo medio incluyeron a estreptococos de los grupos A y C, *Yersinia enterocolitica*, *B. abortus*, *Mycobacterium bovis*, *Pseudomonas aeruginosa*, a quien se consideran un patógeno oportunista, *Coxiella burnetii* y *A. hydrophila*. Los Estreptococos del grupo A estuvieron implicados en un brote debido a queso elaborado de manera artesanal a partir de leche cruda.

3. *S. aureus* y *C. botulinum* se catalogaron como de bajo riesgo. Aunque *S. aureus* fue el agente causal de varios brotes en las décadas de 1950 y 1960, las mejoras en las tecnologías de producción de queso han minimizado el riesgo.

Aunque la mayoría de las bacterias de las categorías de mediano y bajo riesgo no han estado implicadas en botes alimentarios, se consideran problemáticas porque pueden crecer y han sido aisladas de leche (Roberts *et al.* 2001).

Algunos brotes de intoxicación alimentaria se producen como consecuencia del consumo de quesos elaborados con leche no pasteurizada. Este problema ocurre incluso en países industrializados como Estados Unidos, Francia, Escocia e Inglaterra. En México no se tienen definidos los antecedentes de los productos involucrados; aparentemente se trata de quesos frescos no pasteurizados o contaminados por las personas que los elaboran. En la fabricación de los quesos frescos (sobre todo los de origen artesanal), la leche y el producto se manejan por períodos considerables a temperatura ambiente (Fernández, 2000).

El que un individuo enferme como consecuencia del consumo de un alimento contaminado con un microorganismo patógeno, depende justamente de los tres elementos implicados (y su interrelación) en el propio enunciado: individuo, patógeno y alimento (Tabla 10).

Tabla 10. Factores relacionados con el microorganismo, el individuo y el alimento consumido como potenciales determinantes de un incidente

Componente	Ejemplos de factores
Microorganismo	Viabilidad; virulencia; número
Alimento	Composición; cantidad consumida; distribución del agente patógeno.
Individuo	Barreras naturales; inmunocompetencia

Tomada de Fernández, 2000

Diversos factores influyen en la presencia y supervivencia de patógenos en los quesos; como son características del patógeno, tolerancia al calor, ácido y sal, número inicialmente presente y su estado fisiológico. Las etapas de fabricación afectan también a la sobrevivencia de los patógenos. Entre los parámetros que adquieren importancia cabe destacar la temperatura de almacenamiento y procesado, la producción de ácido por los cultivos iniciadores, la adición de sal y otros inhibidores y el proceso de maduración (Roberts *et al.* 2001).

3. JUSTIFICACIÓN

Desde que las BAL se usaron en forma empírica para retardar el deterioro y conservar los alimentos a través de fermentaciones naturales, han tenido aplicación comercial como cultivos iniciadores en las industrias de lácteos, panadería, cárnicos, vegetales y bebidas alcohólicas.

Por lo anterior la identificación de cepas de BAL capaces de inhibir bacterias patógenas y/o deterioradoras, crea una alternativa para el uso de las BAL como cultivos iniciadores ya que además de llevar a cabo el proceso de fermentación, contribuye a incrementar la calidad de los productos al mismo tiempo que disminuye el riesgo de enfermedad asociado a su consumo.

El aislamiento y la identificación de las cepas de BAL a partir de productos lácteos elaborados de manera artesanal en el Estado de Hidalgo, permitirá el empleo de estas cepas como conservadores naturales en diversos alimentos, principalmente en los que se elaboran de forma artesanal.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la capacidad inhibitoria de cepas de BAL aisladas a partir de productos lácteos frente a bacterias patógenas y/o deterioradoras de alimentos.

Objetivos específicos:

- Evaluar la acción inhibitoria de las BAL sobre bacterias de prueba.
- Identificar que géneros de BAL presentan mayor actividad antimicrobiana que puedan utilizarse para caracterizar los metabolitos responsables de dicha actividad.
- Integrar una colección de cepas de BAL con propiedades antibacterianas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

- Cepas de BAL aisladas de productos lácteos adquiridos en diferentes comercios del Estado de Hidalgo, trabajo previo realizado por Clavel (2006). Las cepas de BAL aisladas fueron identificadas bioquímicamente con el sistema miniaturizado API 50CHL, trabajo realizado por Ortíz (2006). Esta información se muestra en la tabla 11.

- Cepas de microorganismos de prueba, 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:

Bacterias Gram positivas

- *Bacillus subtilis*
- *Listeria monocytogenes* LCDC81-860

Bacterias Gram negativas

- *Vibrio fluvialis*
- *V. parahaemolyticus*
- *Shigella flexneri* ATCC 9199
- *Enterobacter aerogenes*
- *Proteus mirabilis*
- *Salmonella typhimurium* ATCC 6539
- *Escherichia coli* ATCC 11229
- *Klebsiella pneumoniae*

Tabla 11. Número de cepas de BAL aisladas e identificadas bioquímicamente

Producto	No. de cepas de BAL aisladas	Género y especie
Queso Oaxaca	37	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	25	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
	21	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	16	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
	7	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	6	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
	6	<i>Lactobacillus brevis</i>
	5	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
	1	<i>Carnobacterium piscicola</i>
	1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Queso Panela	15	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	14	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
	4	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	3	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
	2	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
	1	<i>Lactobacillus brevis</i>
	1	<i>Lactobacillus curvatus</i>
	1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
	1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Queso Canasto	12	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
	3	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	1	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
	1	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
	1	<i>Lactobacillus brevis</i>
Queso Manchego	8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
	4	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	1	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	1	<i>Lactobacillus curvatus</i>
	1	<i>Lactobacillus brevis</i>

(Continúa)

(Continuación)

Producto	No de cepas de BAL aisladas	Género y especie
Leche	8	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	2	<i>Lactobacillus pentosus</i>
Queso Ranchero	4	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Queso Botanero	3	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
	1	<i>Lactobacillus brevis</i>
	1	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Queso Cotija	1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
	1	<i>Lactobacillus brevis</i>
	1	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Queso Molido	5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
	2	<i>Lactobacillus curvatus</i>
	1	<i>Lactobacillus pentosus</i>
Requeson	7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
	1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	1	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
Queso Blanco	6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	2	<i>Lactobacillus pentosus</i>
Queso doble crema	5	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	2	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
	1	<i>Lactobacillus curvatus</i>
	1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	1	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
Total	280	

Adaptada de Clavel, 2006 y Ortiz, 2006.

5.2. Desarrollo experimental del proyecto

Este trabajo formó parte de un proyecto que se llevó acabo en tres etapas como se muestra en la figura 3.

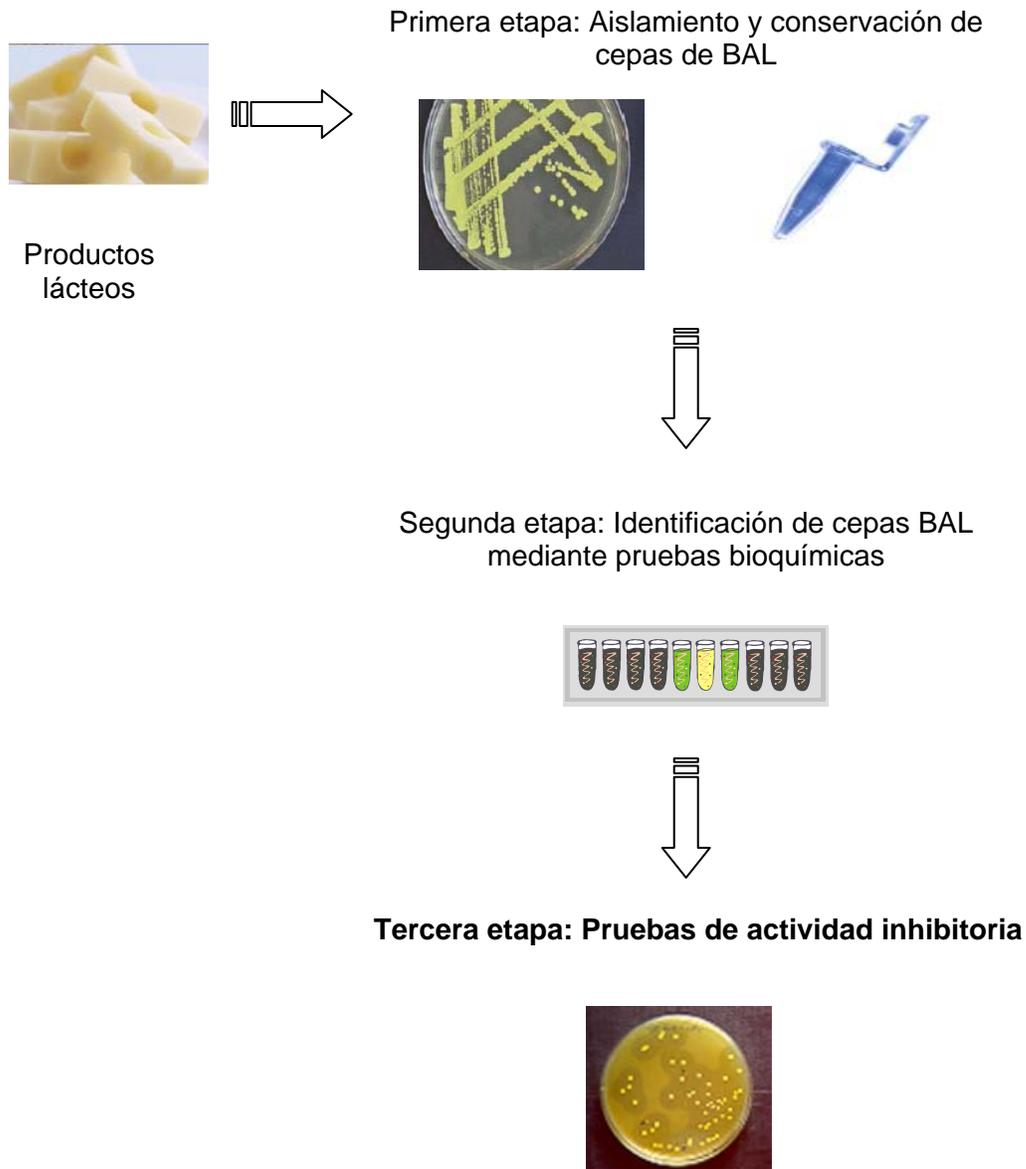


Figura 3. Diagrama experimental del proyecto

5.3. Pruebas para verificar la pureza de las cepas de BAL

El procedimiento seguido para verificar la pureza de las cepas de BAL se muestra en la figura 4. La tinción de Gram y las pruebas de catalasa y oxida, se realizaron utilizando la siguiente metodología.

Tinción de Gram: Colocar con el asa una gota de agua en el centro del portaobjetos. Tomar con el asa estéril un fragmento del crecimiento de la colonia y hacer una suspensión homogénea en la gota de agua. Dejar secar al aire y posteriormente fijar el frotis al calor. Cubrir con cristal violeta el portaobjetos, dejarlo reaccionar por 1 min. Quitar el exceso de colorante y lavar con agua corriente. Aplicar el yodo de Gram y dejar reaccionar por 1 min, lavar en la llave. Con cuidado se agrega alcohol cetona, gota a gota con el portaobjetos inclinado, tan pronto como las gotas de solución ya no arrastren color. Se cubre el portaobjetos con la solución de safranina de Gram y dejarla reaccionar por 10 o 20 s, lavar el exceso de colorante y secar al aire. Las bacterias Gram positivas se ven al microscopio de color púrpura y las Gram negativas de color rojo.

Prueba de catalasa: Con una asa estéril tomar una colonia de un cultivo puro de 18 a 24 h de incubación y colocarla sobre un portaobjetos, agregar una gota de H₂O₂ al 30% sobre el cultivo y observar la inmediata formación de burbujas (liberación de gas) lo cual indica que la prueba es positiva.

Prueba de oxidasa: Se coloca un trozo de papel de filtro de 3x3 cm aproximadamente en una placa de Petri, agregar 2-3 gotas del reactivo para oxidasa, clorohidrato u oxalato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% (Kovacs) en el centro del papel, extender con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado. La reacción de color positiva (rosa-rojo-negro) se produce a los 5-10 s, este es el indicativo de que la prueba es positiva.

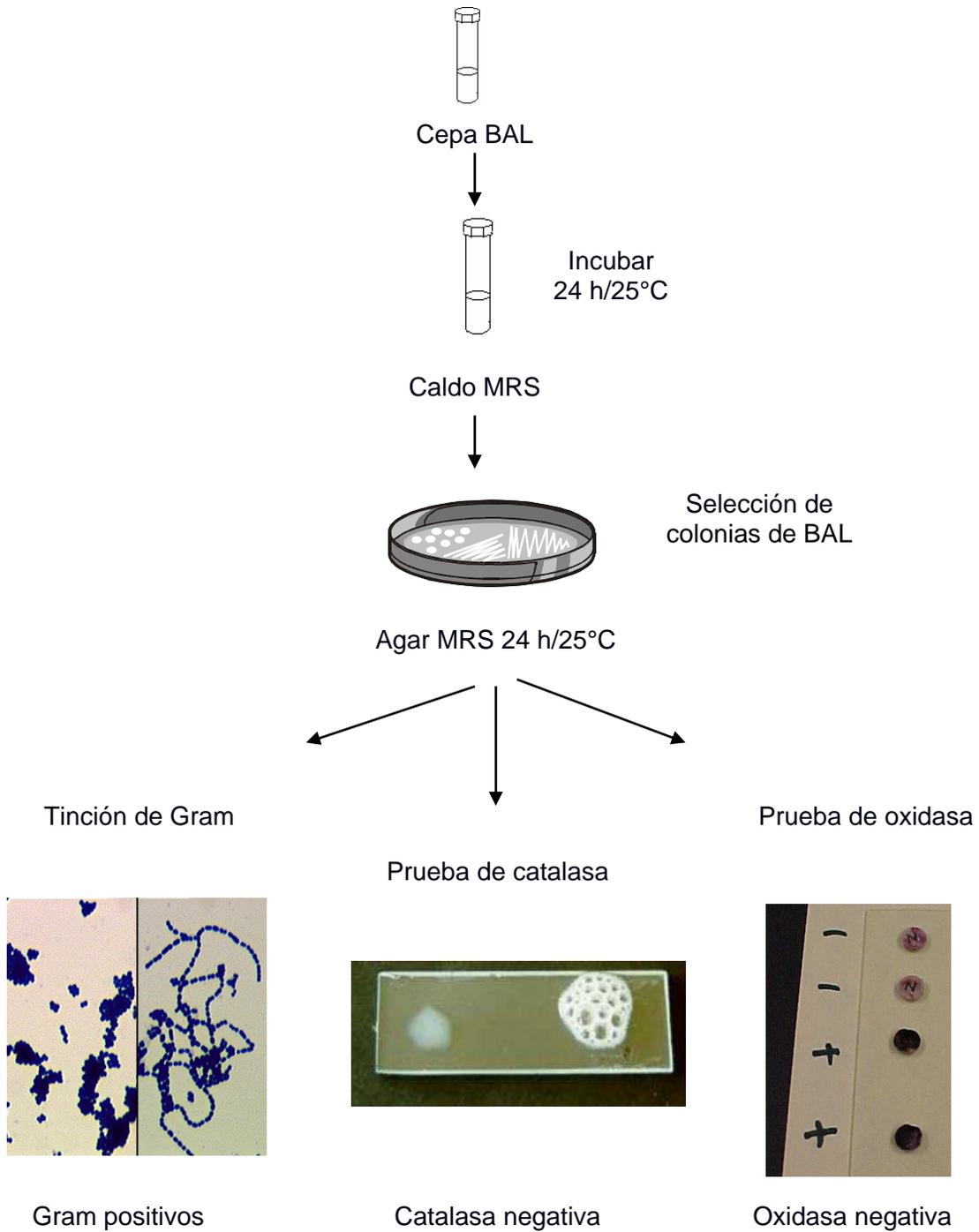


Figura 4. Diagrama del procedimiento para verificar la pureza de las BAL

5.4. Pruebas de actividad inhibitoria

La actividad inhibitoria de las 280 cepas de BAL se probó frente a 10 cepas de bacterias de prueba (patógenas y/o deterioradoras), que incluyó tanto Gram positivas como Gram negativas. El procedimiento utilizado se muestra en la figura 5 y se describe a continuación:

Las cepas de BAL se descongelaron a temperatura ambiente al momento de ser utilizadas, posteriormente se sembraron en tubos con 5 mL de caldo MRS (DIFCO™) y se incubaron durante 24 hr a 25°C (Incubadora bacteriológica Blue M); de este cultivo se tomó una asada y se sembró por estría en placas de agar MRS (MERCK), las cuales se incubaron por 24 h a 25°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se seleccionaron las colonias aisladas, se sembraron en caldo MRS sin glucosa y se incubaron de 18 h a 25°C. De este cultivo, se tomaron 15 µL y se depositaron sobre una placa de agar MRS sin glucosa, dejando secar la gota, este proceso se realizó en campana de flujo laminar (Labconco Purifier Clas II) y se incubó por 24 h a 25°C. Transcurrido el periodo de incubación, sobre el centro de la placa se colocó un sensidisco con 7 µL de antibiótico (Tabla 12), el cual sirvió como control positivo de la prueba. Posteriormente se adicionó a la placa una sobre capa de agar soya tripticaseína modificado al 1% previamente inoculado con 20 µL de un cultivo del microorganismo de prueba. El inóculo de la bacteria de prueba se obtuvo a partir del crecimiento en agar soya tripticaseína (BIOXON) el cual se pasó a un tubo con caldo soya tripticaseína (BIOXON) que se incubó por 24 h a 37°C (Incubadora Ríos Rocha).

Las cajas con la sobrecapa se dejaron solidificar a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron por 24 h a 37°C y pasado este tiempo se observó la formación de halos de inhibición del crecimiento de la bacteria de prueba (Lewus y Montville, 1991).

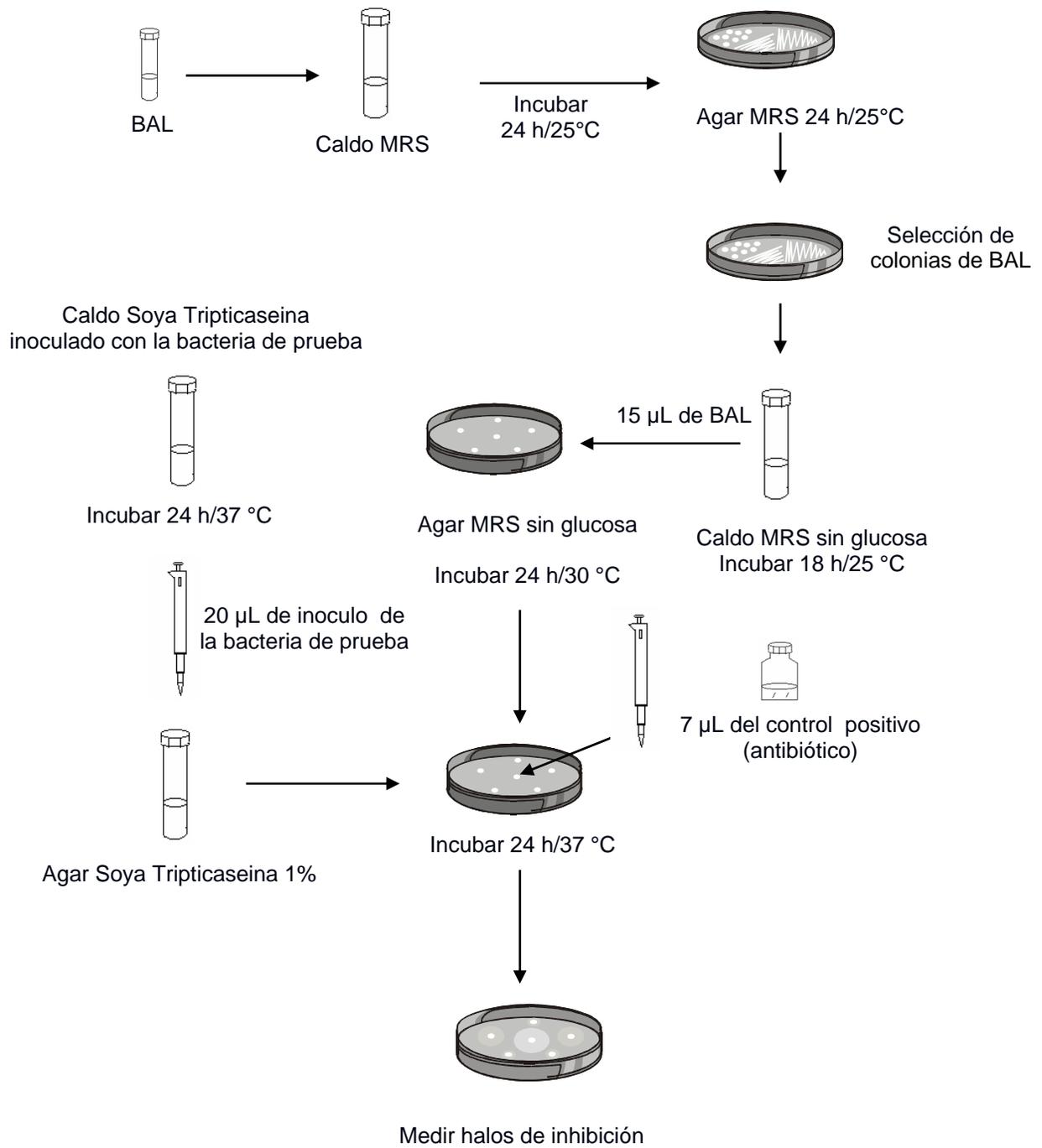


Figura 5. Diagrama del procedimiento de las pruebas de actividad inhibitoria

Tabla 12. Concentración del antibióticos utilizados como control positivo.

Cepa	Antibiótico	Concentración
<i>Vibrio fluvialis</i>	Estreptomicina	1mg/mL
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Estreptomicina	1mg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ampicilina	1mg/mL
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Estreptomicina	1mg/mL
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 6539	Estreptomicina	1mg/mL
<i>Listeria monocytogenes</i> LCDC81-860	Estreptomicina	1mg/mL
<i>Bacillus subtilis</i>	Estreptomicina	1mg/mL
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199	Estreptomicina	1mg/mL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	Estreptomicina	1mg/mL
<i>Proteus mirabilis</i>	Estreptomicina	1mg/mL

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Purificación de cepas de BAL

Para asegurar una buena identificación de las cepas de BAL con actividad inhibitoria así como la confiabilidad de los resultados se requería garantizar la pureza de las cepas, lo cual a su vez dependería de un buen aislamiento para lo cual se utilizó el medio MRS ya que estimula eficazmente el crecimiento de la mayoría de las cepas que no crecen bien en otros medios elaborados para este fin.

El medio MRS es utilizado comúnmente para el recuento y aislamiento de BAL debido a que es un medio selectivo y tienen un buen desarrollo, fundamentalmente cuando son aisladas de productos lácteos y fuentes humanas, al agrupar la acción del citrato, acetato, Tween 80, Mg^{2+} y Mn^{2+} , los cuales actúan como factores de crecimiento para las BAL, principalmente para los lactobacilos, además de que es un medio rico en nutrientes, es necesario señalar que no permite un buen desarrollo de BAL aisladas a partir de cereales y vegetales (Amador, 1993).

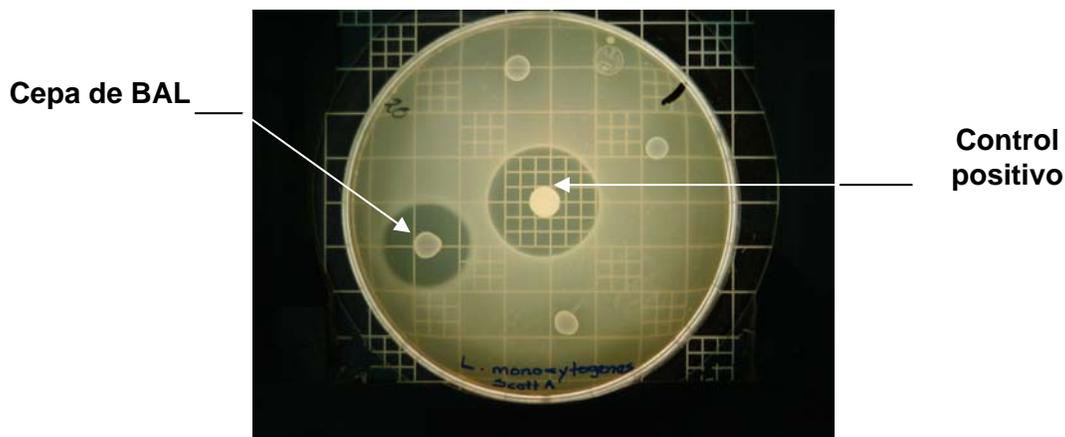
La comprobación de la pureza de las cepas de BAL se basó en algunas características de morfología macroscópica como las siguientes: colonias de color blanco o cremoso, pequeñas, superficie convexa, de forma redonda y bordes enteros. La pureza fué corroborada con la tinción de Gram, mediante la cual se observaron características morfológicas comprobando que se tenían cocos y bacilos Gram positivos.

Así se seleccionaron todas aquellas colonias que presentaban las características macro y microscópicas correspondientes a BAL. De igual manera las pruebas de catalasa y oxidasa fueron negativas, característica de las BAL. Con cada una de estas cepas puras se procedió a evaluar la actividad inhibitoria.

6.2. Actividad inhibitoria de BAL

Se determinó la actividad inhibitoria de 280 cepas aisladas e identificadas como BAL, con la técnica de la doble capa descrita por Lewus y Montville (1991). Del medio MRS, se eliminó la glucosa para eliminar la producción de ácido, de esta manera podemos suponer que la inhibición se debe a la producción de otros metabolitos y no al ácido producido durante la fermentación. El resultado se consideró positivo cuando se formó un halo de inhibición de la bacteria de prueba alrededor de la colonia de la BAL, como se observa en la figura 6.

Figura 6. Inhibición del crecimiento de la bacteria de prueba por BAL.



Como control positivo se utilizaron los antibióticos ampicilina y estreptomycin a una concentración de 1 mg/mL para inhibir las bacterias de prueba de acuerdo a lo indicado por González (2004).

Al realizar las pruebas de actividad inhibitoria se observó que de las 280 cepas de BAL sólo 55 cepas, que corresponden al 19.64% presentaron actividad contra una o más bacterias de prueba; las 225 cepas restantes (80.36%) no mostraron actividad.

La capacidad que presentan las BAL para inhibir el crecimiento de microorganismos se debe a diversos factores, el primero de ellos es la reducción del pH generado por la utilización de los carbohidratos disponibles en el medio,

también se conocen otros metabolitos con efecto inhibitorio como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, radicales libres, diacetilo, acetaldehído, isómeros D de los aminoácidos, antibióticos y bacteriocinas (Davidson y Hoover, 1993).

Zamora (2003) refiere que el desarrollo en aerobiosis de las BAL conduce a la formación de metabolitos secundarios como el oxígeno, peróxido de hidrógeno, aniones superóxido y radicales libres que poseen actividad bacteriostática y bactericida frente a diferentes a bacterias.

Por lo anterior podemos suponer que el efecto inhibitorio que presentaron las cepas de BAL en este trabajo se debe a la presencia de alguno de los metabolitos antes mencionados, dado que la incubación se realizó en condiciones de aerobiosis, no descartando que esta inhibición pueda ser también por bacteriocinas.

El 50% de las cepas aisladas de leche mostraron actividad inhibitoria esto de puede deber a que la leche no recibió tratamiento térmico que afectara a la flora microbiana nativa. En el caso de los quesos blanco y botanero la actividad inhibitoria que presentaron estas cepas fue de 50 y 57% respectivamente, al tratarse de quesos elaborados de manera artesanal donde el componente la leche la cual no recibe un tratamiento térmico como la pasteurización, las BAL pueden sobrevivir al proceso de elaboración de estos productos además de que su conservación no siempre se da en las mejores condiciones ya que no se sigue una cadena de refrigeración hasta el momento de su venta.

Los resultados muestran que las cepas con mayor actividad inhibitoria se aislaron a partir de queso botanero, queso blanco y de leche como se muestra en la siguiente tabla 13.

Tabla 13. Origen de las cepas de BAL que presentaron actividad inhibitoria

Producto	No. de muestras por producto	No. de cepas aisladas	No. de cepas con actividad inhibitoria	% de cepas con actividad
Queso Oaxaca	14	125	24	19
Queso panela	5	43	9	21
Queso canasto	4	29	1	3
Queso manchego	2	16	3	20
Queso doble crema	1	11	3	27
Leche	1	10	5	50
Queso blanco	1	10	5	50
Requesón	1	9	0	0
Queso molido	1	8	0	0
Queso botanero	1	7	4	57
Queso ranchero	1	7	1	14
Queso cotija	1	5	0	0

Las cepas aisladas del queso cotija y de requesón no mostraron actividad inhibitoria contra alguna de las bacterias de prueba, con este resultado es importante mencionar que no se determino la concentración de las BAL para evaluar la actividad inhibitoria siendo este un factor importante para determinar si la cantidad de metabolitos generados fue insuficiente para lograr la inhibición de las bacterias de prueba.

Existen trabajos de investigación como el de Hernández *et al.* (2004) donde aislaron cepas de BAL a partir de queso las cuales presentaron actividad inhibitoria contra bacterias como *Bacillus cereus*, *Clostridium sporogenes*, *S. aureus*, *Shigella sonnei* y *Kb. pneumoniae*. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo donde las cepas de BAL aisladas de queso presentan actividad inhibitoria frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas por lo que estas cepas de BAL podría ser utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración de productos lácteos.

Arqués *et al.* (2004) evaluaron la actividad de las BAL productoras de bacteriocinas, el trabajo se realizó utilizando quesos elaborados con leche inoculada con *S. aureus* más un cultivo iniciador comercial de BAL, estos resultados nos confirman la buena capacidad que tienen las BAL para inhibir a *S. aureus*.

6.3. Cepas de BAL que mostraron actividad inhibitoria.

Los resultados obtenidos en este trabajo, en cuanto a los géneros que mostraron actividad inhibitoria frente a las bacterias de prueba, se muestra en la tabla 14 y son similares a lo que reportan Hernández *et al.* (2004) donde a partir de 180 cepas de BAL aisladas de productos lácteos predominaron los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus* donde *Lb. plantarum* mostró una alta actividad inhibitoria frente a las bacterias de prueba.

En el estudio realizado por Ligocka y Paluszak (2004) donde determinaron la capacidad de las BAL para inhibir microorganismos patógenos, se encontró que bajo condiciones de anaerobiosis los metabolitos más importantes son las bacteriocinas y en aerobiosis el ácido láctico y el H₂O₂. También reportaron que las cepas de *Lb. plantarum* y *Lb. brevis* presentan buena capacidad inhibitoria frente a *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. mirabilis* en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis.

Con respecto a las cepas de BAL que muestran actividad inhibitoria existen trabajos como el de Murry *et al.* (2004) donde hacen evidente la actividad inhibitoria de cepas de BAL contra *E. coli*, *S. typhimurium* y *Clostridium perfringens* este efecto fué atribuido a los metabolitos que produce esta cepa.

Tabla 14. Cepas de BAL que presentan actividad inhibitoria frente a una o más bacterias de prueba.

Código de cepa BAL	Género y especie	Bacterias de prueba										
		<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 6539	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> LCDC81-860	No de bacterias de prueba que inhibe
104	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp <i>mesenteroides</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	1
105	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	2
107	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	3
108	<i>Lactobacillus pentosus</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	2
110	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	4
203	<i>Lactobacillus pentosus</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
204	<i>Lactobacillus brevis</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
206	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	2
209	<i>Lactobacillus pentosus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	1
302	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
401	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
405	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp <i>mesenteroides</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
408	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
503	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
504	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
505	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
506	<i>Lactobacillus pentosus</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
507	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	2
603	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp <i>mesenteroides</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	2
604	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp <i>mesenteroides</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
605	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp <i>mesenteroides</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	1
609	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	2
610	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	2
701	<i>Lactobacillus pentosus</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	2
702	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	2
805	<i>Lactobacillus pentosus</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
906	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
907	<i>Lactobacillus pentosus</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
909	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp <i>mesenteroides</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
910	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
1001	<i>Lactobacillus pentosus</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
1009	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp <i>mesenteroides</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
1010	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
1603	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	1

(Continúa)

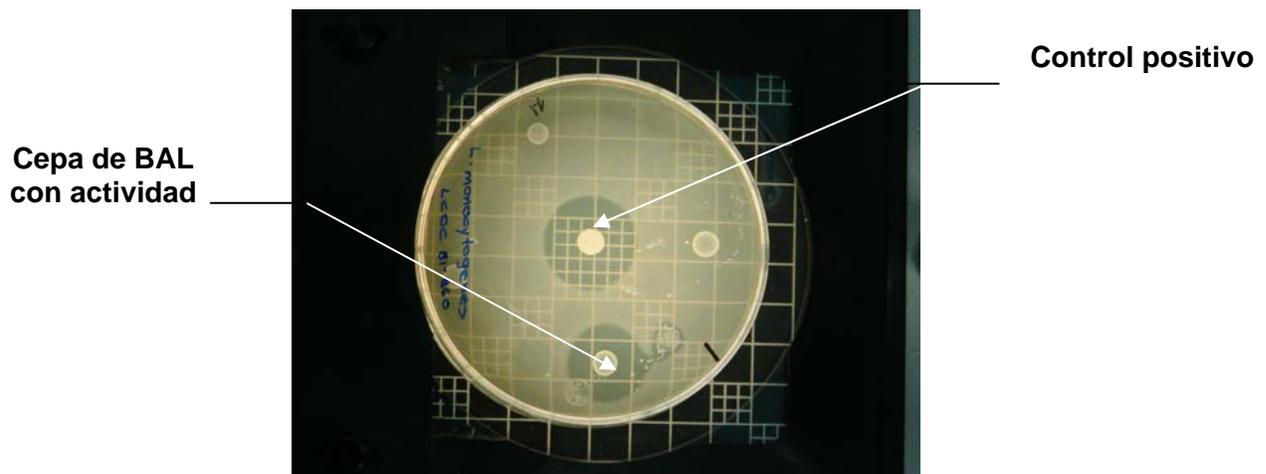
(Continuación)

Código de cepa BAL	Género y especie	Bacterias de prueba										No de bacterias de prueba que inhibe
		<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 6539	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> LCDC81-860	
1802	<i>Lactococcus lactis subesp lactis</i>	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	3
1803	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	2
2306	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	2
2405	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp mesenteroides</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
2508	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp mesenteroides</i>	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
2509	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp mesenteroides</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
2510	<i>Lactobacillus brevis</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	3
2601	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp mesenteroides</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
2602	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
2604	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp mesenteroides</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
2608	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp mesenteroides</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
2609	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp mesenteroides</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
2610	<i>Lactobacillus pentosus</i>	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
2704	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
3110	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp mesenteroides</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
3210	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
3302	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
3307	<i>Lactobacillus pentosus</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	2
3308	<i>Leuconostoc mesenteroides subesp mesenteroides</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
3309	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	2
3310	<i>Lactobacillus pentosus</i>	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1

(+) : Presentó inhibición (-) : No presentó inhibición

Las cepas de *Lb. pentosus* y *Leuc. mesenteroides subsp. mesenteroides* utilizadas en este trabajo presentaron actividad inhibitoria frente a *L. monocytogenes* (figura 7), estos datos son de importancia ya que esta bacteria esta presente varios productos que se consumen de manera cotidiana como la leche cruda, quesos blandos, helado de crema y otros productos lácteos.

Figura 7. Actividad inhibitoria de *Lb. pentosus* frente a *L. monocytogenes*



La actividad mostrada frente a *L. monocytogenes* es de resaltar debido a que este microorganismo origina un problema de salud pública ya que puede ocasionar infecciones durante la gestación, además de sepsis y meningoencefalitis entre otras. La mayoría de los consumidores contrae listeriosis por el consumo de alimentos (vía oral) contaminados con este microorganismo. El microorganismo es termolábil y puede ser destruido como otros patógenos durante la cocción; sin embargo en general, se considera más resistente al calor que otros patógenos (Torres, 2002).

La nisina, polipéptido antimicrobiano producido por *Lc. lactis* ha sido considerada como un conservador en alimentos para controlar el crecimiento de bacterias Gram positivas, incluidas *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. Durante un periodo de

incubación de 72 h, la nisina inhibió por completo a *L. ivanovii* a una concentración de 32UI/mL, la cepa de *L. monocytogenes* fue menos sensible ya que se requirió un nivel de 256 UI de nisina/mL para inhibirla (Torres, 2002).

Es de importancia dar continuidad a este trabajo con la identificación de los metabolitos que producen las cepas de BAL que inhibieron a *L. monocytogenes* por el problema de salud que ocasiona y por la frecuencia con que se aísla esta bacteria de los productos lácteos.

De las bacterias de prueba utilizadas para evaluar la capacidad inhibitoria de las BAL, las especies de *Vibrio* fueron *V. fluvialis* y *V. parahaemolyticus* ambas con muy sensibles a los metabolitos producidos por las BAL y en especial *V. fluvialis* (Tabla 15).

Tabla 15. Número de cepas de BAL que inhibieron a bacterias de prueba

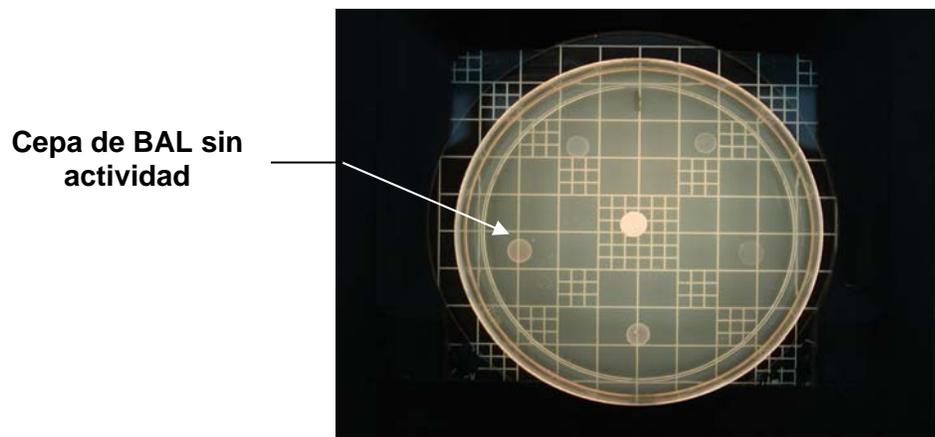
Bacterias de prueba	No de cepas BAL que inhibieron a esta bacteria	% de actividad de cepas de BAL
<i>Vibrio fluvialis</i>	29	37.7
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	26	33.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	10.4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	5.2
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 6539	4	5.2
<i>Listeria monocytogenes</i> LCDC81-860	2	2.6
<i>Bacillus subtilis</i>	2	2.6
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199	1	1.3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	1	1.3
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0
Total	77	100

Es importante mencionar que *Vibrio* puede crecer en condiciones alcalinas, sobre un pH máximo de 10.0, pero es inhibido cuando el pH baja a 6.0 o menos, este es un dato importante porque a pesar de haber eliminado la glucosa del medio MRS,

para evitar la producción de ácido, se pueden presentar concentraciones de ácido suficientes para inhibir a este microorganismo (Fernández, 2000).

Es de hacer notar el hecho que en este trabajo ninguna de las cepas de BAL presentó actividad inhibitoria frente a *P. mirabilis* como se muestra en la figura 8, esto puede deberse a que la cantidad de metabolitos producidos por las cepas de BAL no fue suficiente o bien que la cepa es resistente a alguno de los metabolitos que estas producen.

Figura 8. Cepas de BAL que no mostraron actividad inhibitoria frente a *P. mirabilis*.



Uno de los metabolitos de gran importancia en el fenómeno de inhibición bacteriana son las bacteriocinas, que se definen como un grupo heterogéneo de proteínas y que varían en su espectro antimicrobiano ya que mientras algunas son activas únicamente frente a bacterias taxonómicamente relacionadas, otras lo son frente a un amplio grupo de bacterias Gram positivas (Klaenhammer, 1988).

Conviene señalar que todavía no se conocen bacteriocinas producidas por BAL de origen alimentario activas naturalmente frente a bacterias Gram negativas, aunque

su actividad es detectable cuando las bacterias se someten a la acción de sustancias que modifican su permeabilidad, por ejemplo se ha comprobado que en determinadas condiciones y utilizadas conjuntamente con agentes quelantes, la nisina inhibe especies de *Salmonella* y otros microorganismos Gram negativos (Stevens *et al.* 1992).

En el caso de las bacteriocinas Zamora (2003) describe que por lo general no actúan contra bacterias Gram negativas a menos que la pared celular se encuentre debilitada ya que por lo general actúa destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácidos nucleicos.

Por lo tanto, el efecto de inhibición que se presentó en este trabajo se puede asociar a la diferencia que existe en estos tipos de bacterias ya que las Gram negativas poseen además de su pared celular una membrana externa que actúa como barrera selectiva al paso de alguna macromoléculas como las bacteriocinas o enzimas. Esta membrana exterior esta compuesta por una bicapa lipídica que contiene fosfolípidos en la parte interna, lipopolisacáridos en la capa externa y proteínas que la atraviesan en todo su espesor y que delimitan poros hidrófilos, denominadas porinas, que permiten el paso de estos metabolitos de bajo peso molecular (Prescott *et al.* 1999).

El número mayor de cepas de BAL con actividad corresponde a los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. El género *Lactococcus* presentó mayor actividad ya que el 40% de las cepas identificadas inhibió a una o más bacterias de prueba, esta información se muestra en la tabla 16.

La capacidad inhibitoria de *Lactococcus* fué probablemente la primera en reconocerse en 1930. Esta inhibición se debe a bacteriocinas como la nisina, diplococcina y lactostrepcina La inhibición por *Leuconostoc* ha sido atribuida principalmente a la producción de ácido láctico, ácido acético y diacetilo. Así

mismo los *Lactobacillus* son fuertes productores de peróxido de hidrógeno que es un metabolito con capacidad inhibitoria (Davidson y Hoover, 1993).

Tabla 16. Porcentaje de cepas de BAL con actividad inhibitoria por género y especie.

Género y especie	Total de cepas identificadas	No. de cepas de BAL con actividad	% de cepas de BAL con actividad
<i>Lactobacillus plantarum</i>	90	19	11
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	79	16	20
<i>Lactobacillus pentosus</i>	41	12	7
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	22	2	20
<i>Lactobacillus brevis</i>	11	2	1.2
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	10	2	20
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	8	2	1.2

Se recomienda caracterizar los metabolitos producidos por estas cepas de BAL para identificar si el efecto inhibitorio se debe a la producción de bacteriocinas o a cualquiera de los otros metabolitos.

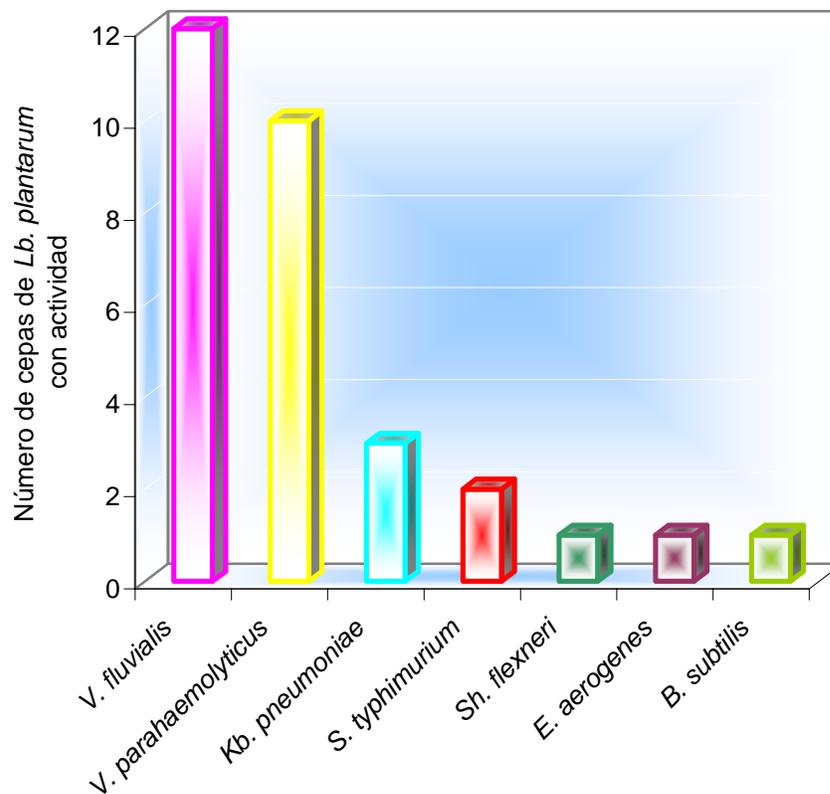
6.3.1. *Lactobocillus plantarum*

La cepa de *Lb. plantarum* identificada con el número 110 inhibió a cuatro de las diez bacterias de prueba utilizadas. Los resultados del presente trabajo muestran un amplio espectro de las cepas de *Lb. plantarum* hacia bacterias Gram negativas como *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *Kb. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *Sh. flexneri* y *E. aerogenes*. Así también hacia *B. subtilis*, una bacteria Gram positiva (Figura 9).

Las dos especies de *Vibrio* fueron las más sensibles al efecto de los metabolitos producidos por las cepas de *Lb. plantarum* y las bacterias de prueba menos sensibles a la actividad inhibitoria de BAL son *Sh. flexneri*, *E. aerogenes* y *B.*

subtilis. De manera general fue *Lb. plantarum* una de las cepas que presentó un amplio espectro de inhibición en especial para inhibir bacterias Gram negativas.

Figura 9. Actividad inhibitoria de *Lb. plantarum* frente a bacterias de prueba.



Murry *et al.* (2004) caracterizaron los compuestos producidos por *Lb. plantarum* y *Lb. salivarius* responsables de la inhibición de *E. coli* y *S. typhimurium*. Estas especies de *Lactobacillus* producen niveles de pH bajos por la fermentación de los carbohidratos, por lo que la inhibición se asocia a la producción de ácido láctico y ácido acético que inhiben el crecimiento de estas bacterias Gram negativas.

En un estudio realizado por Hernández *et al.* (2004) se reportó la capacidad de las cepas de BAL aisladas de queso para producir compuestos antimicrobianos, identificaron a *Lb. plantarum* TF711 y caracterizaron una bacteriocina de nombre

plantaricina TF711, la cual presentó actividad antimicrobiana en un amplio rango de pH que va de 1 a 9, la actividad antimicrobiana se presentó contra a bacterias como *B. cereus*, *Clostridium sporogenes*, *S. aureus*, *Sh. sonnei* y *Kb. pneumoniae*. Por lo reportado en estos trabajos donde se analizó la actividad de *Lb. plantarum* se observa el amplio espectro de inhibición que esta cepa presenta frente a bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas.

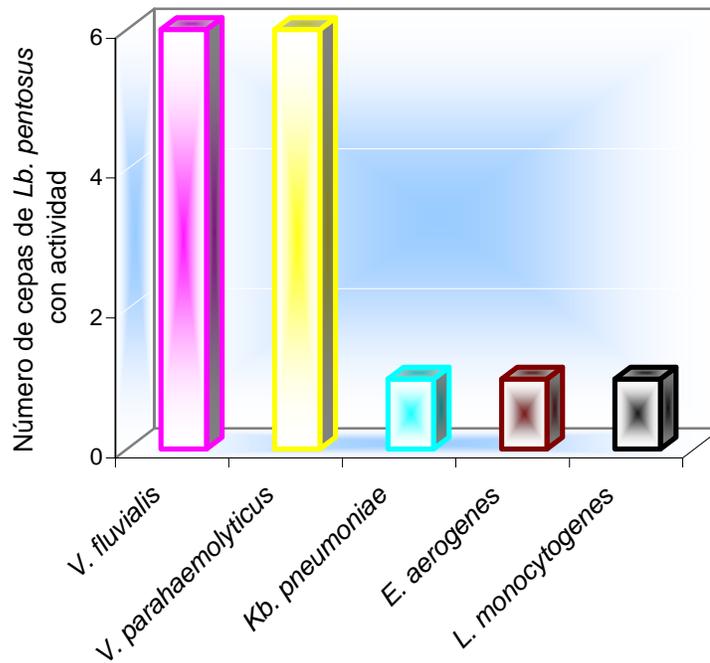
6.3.2. *Lactobacillus pentosus*

De las cepas de *Lb. pentosus* con actividad inhibitoria, seis presentaron actividad frente a *V. fluvialis* y *V. parahaemolyticus*, solo una cepa presentó actividad contra *Kb. pneumoniae*, *E. aerogenes* y *L. monocytogenes*, la información se muestra en la figura 10.

Las cepas de *V. fluvialis* y *V. parahaemolyticus* presentaron en general alta sensibilidad no solo a los metabolitos que produce *Lb. pentosus* sino también a los que producen las cepas de *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. rhamnosus*, *Lc. lactis* subsp *lactis* y *Leuc. mesenteroides* subsp *mesenteroides*. Aún cuando no se encontraron muchas publicaciones sobre la actividad inhibitoria de BAL frente a *V. fluvialis* y *V. parahaemolyticus*.

La presencia de *Lactobacillus* como parte de los componentes de los productos lácteos y embutidos fermentados, puede disminuir la velocidad de crecimiento de *Listeria* o bien inhibirla (Torres, 2002).

En los resultados obtenidos en este trabajo no se observó una alto número de cepas de BAL que inhibieran a *L. monocytogenes* esto se puede asociar a que los metabolitos producidos por esta cepa no se encuentran en una concentración adecuada para este efecto.

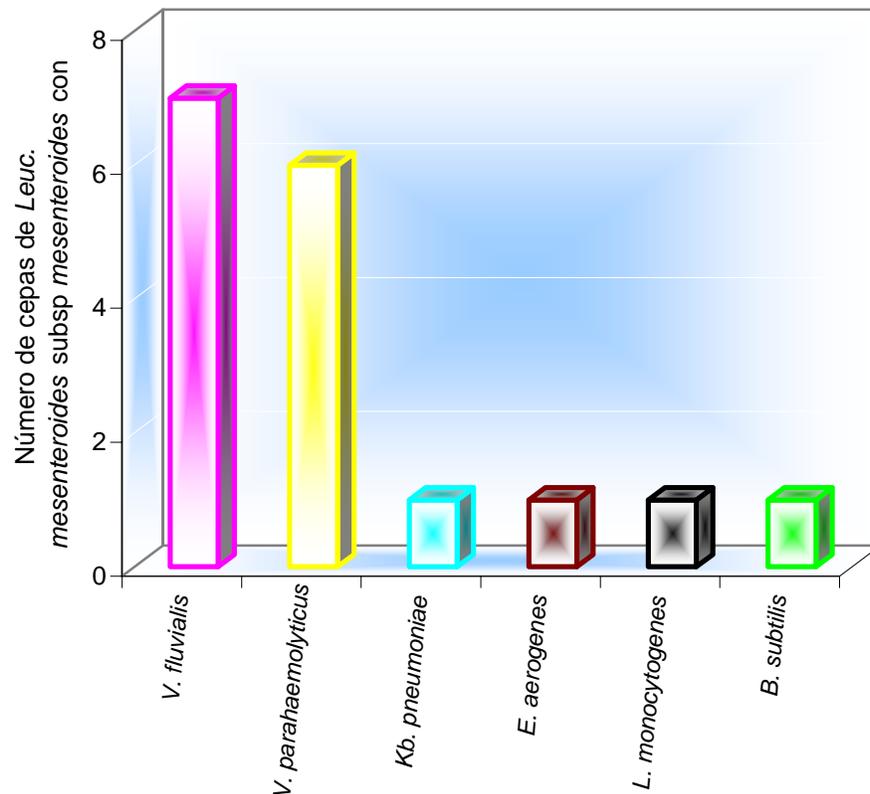
Figura 10. Actividad inhibitoria de *Lb. pentosus* frente a bacterias de prueba

6.3.3. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*

La actividad inhibitoria que mostraron las cepas de *Leuc. mesenteroides* subsp *mesenteroides* en este estudio se dió tanto para bacterias Gram positivas como *L. monocytogenes* y *B. subtilis*, así mismo inhibió bacterias Gram negativas como *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *Kb. pneumoniae*, *L. monocytogenes* y *E. aerogenes*.

Lc. mesenteroides subsp *mesenteroides* es otra de las cepas que mostró un amplio espectro de inhibición siendo las especies de *Vibrio* las más sensibles a los metabolitos que esta cepa produce, estos resultados se observan en la figura 11.

Figura 11. Actividad inhibitoria de *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* frente a bacterias de prueba de prueba.



En un estudio previo Daba *et al.* (1991) aislaron a partir de queso Cheddar cepas de *Leuc. mesenteroides* las cuales fueron caracterizada utilizando el sistema API 50 y utilizaron para agar MRS para la producción de bacteriocinas, la actividad de la bacteriocinas se probó contra diferentes especies de *L. monocytogenes*, las más sensibles fueron *L. monocytogenes* Scott A3, *L. monocytogenes* Lm21 y la más resistente fue *L. monocytogenes* Lm8. Las pruebas de actividad también incluyeron otras bacterias como *C. freundii*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Kb. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonellas*, *Yersinia enterocolitica* entre otras, donde no presento ningún efecto bactericida.

De Martinis *et al.* (2001) aislaron cepas de BAL de carne de vacuno, las cepas fueron identificadas como *Lactobacillus curvatus*, *Leuc. mesenteroides* y *Leuconostoc sp.* De los metabolitos producidos por estas cepas solo el 30% fueron identificados como bacteriocinas; esto lo atribuyen a factores intrínsecos de la muestra y a la diversidad de microorganismos indicadores utilizados. Las bacterias de prueba que mostraron sensibilidad a las cepas de BAL fueron *Lb. sake* y *L. monocytogenes*, las cepas de *E. coli* mostraron resistencia a las cepas de BAL.

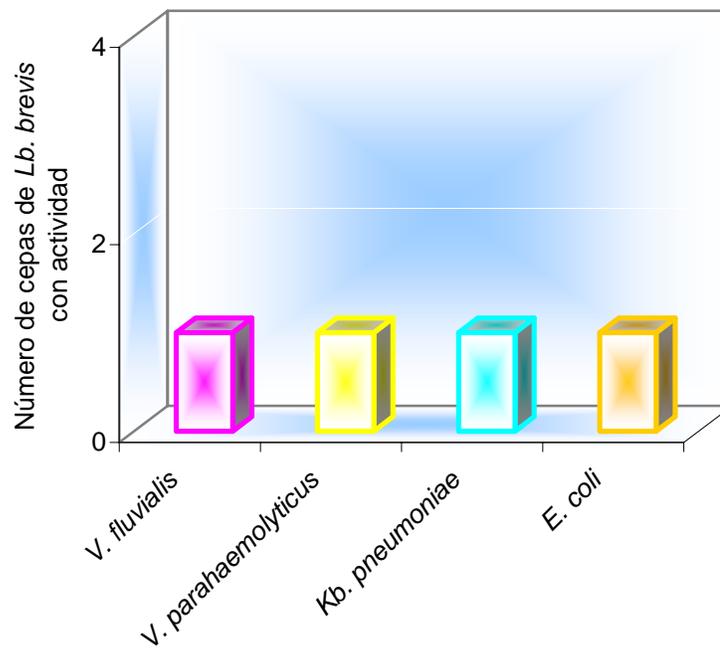
Lo anterior confirma la capacidad que tienen las cepas de *Leuc. mesenteroides* para inhibir bacterias Gram positivas y Gram negativas. Aunque la fuente de donde se aislaron es diferente a la utilizada en este trabajo se observa un buen espectro de inhibición.

6.3.4. *Lactobacillus brevis*

Otra cepa del género *Lactobacillus* que presentó efecto inhibitorio contra bacterias Gram negativas como *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *Kb. pneumoniae* y *E. coli*, fué *Lb. brevis* los datos se muestran en la figura 12.

Estos resultados coinciden con el trabajo realizado por Estrada *et al.* (2005) quienes evaluaron la actividad inhibitoria por el método de difusión en pozos con algunas modificaciones donde a partir de cepas nativas de *Lb. brevis* inhibieron el crecimiento de bacterias como *Salmonella spp* y *E. coli*.

Así también Ligocka y Paluszak (2004), determinaron la capacidad inhibitoria de *Lb. brevis* y *Lb. plantarum*, estas cepas producen metabolitos que afectan la sobrevivencia de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. mirabilis*, este efecto es mayor en condiciones de aerobiosis ya que se favorece la producción de ácido láctico y H₂O₂. En condiciones de anaerobiosis se favorece la producción de metabolitos como las bacteriocinas.

Figura 12. Actividad inhibitoria de *Lb. brevis* frente a bacterias de prueba

Ogunbanwo *et al.* (2003) utilizaron una bacteriocina producida por *Lb. brevis* OG1 y determinaron las mejores condiciones de cultivo para la producción de esta bacteriocina, encontrando que en condiciones anaeróbicas y con el uso de agar MRS con 0.25% de glucosa, el espectro de inhibición se dirige hacia bacterias Gram negativas como *Klebsiella spp*, *V. cholerae*, *E. coli*, entre otras y bacterias Gram positivas como *L. monocytogenes*, *B. subtilis* y *B. cereus*.

En los reportes antes mencionados sobre la actividad de *Lb. brevis* se observa el amplio espectro de inhibición contra bacterias Gram negativas cuando los metabolitos producidos son ácido láctico y H_2O_2 . Cuando se trata de bacteriocinas por lo general la actividad se observa en bacterias Gram positivas.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en este trabajo ya que el espectro de inhibición no fue tan amplio como el que presentan cepas de BAL como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Lb. plantarum* esto se puede deber a que la concentración de los metabolitos producidos por estas cepas no fue suficiente para lograr un efecto bactericida.

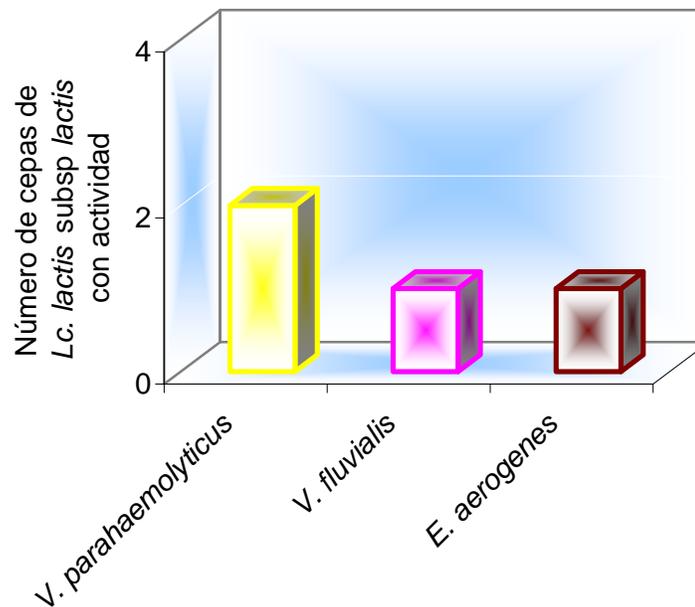
6.3.5. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

La técnica utilizada en este estudio permitió observar que las cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* presentaron actividad frente a las dos especies de *Vibrio* y contra *E. aerogenes*, ambas bacterias Gram negativas esta información se observa en la figura 13.

A pesar de que *Lc. lactis* es una cepa productora de bacteriocinas como lacticin 481, nisina Z, nisina A, entre otras que reporta Arqués *et al.* (2004) en este trabajo el espectro de inhibición no fue amplio y no inhibió a ninguna de las dos bacterias de prueba Gram positivas, cabe mencionar que el número de bacterias Gram negativas utilizadas en este trabajo fué mayor que el correspondiente a las Gram positivas por lo que no podemos asegurar que las cepas de BAL utilizadas no tengan una buena actividad bactericida.

Otro punto importante a considerar es que en los reportes consultados no se enfocan a las bacterias de prueba que en este trabajo se utilizaron. A pesar de que *Lc. lactis* es una cepa productora de bacteriocinas como lacticin 481, nisina Z, nisina A, entre otras que reporta Arqués *et al.* (2004) en este trabajo el espectro de inhibición no fue amplio y no inhibió a ninguna de las dos bacterias de prueba Gram positivas, cabe mencionar que el número de bacterias Gram negativas utilizadas en este trabajo fué mayor que el correspondiente a las Gram positivas por lo que no podemos asegurar que las cepas de BAL utilizadas no tengan una buena actividad bactericida.

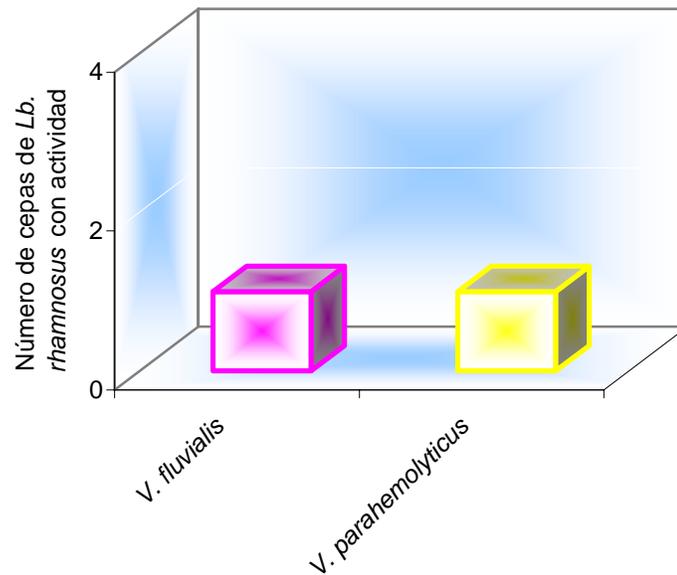
Figura 13. Actividad inhibitoria de *Lc. lactis* subsp. *lactis* frente a bacterias de prueba.



Con los resultados obtenidos en este trabajo no se puede decir *Lc. lactis* no sea un buen productor de metabolitos con actividad inhibitoria sino que talvez las condiciones experimentales usadas no permitieron evidenciar la producción de estos metabolitos. En el presente trabajo solo se llevó a cabo la incubación en condiciones de aerobiosis, por lo que uno de los metabolitos que inhibieron a los microorganismos patógenos pudo ser es el H_2O_2 y ácido láctico

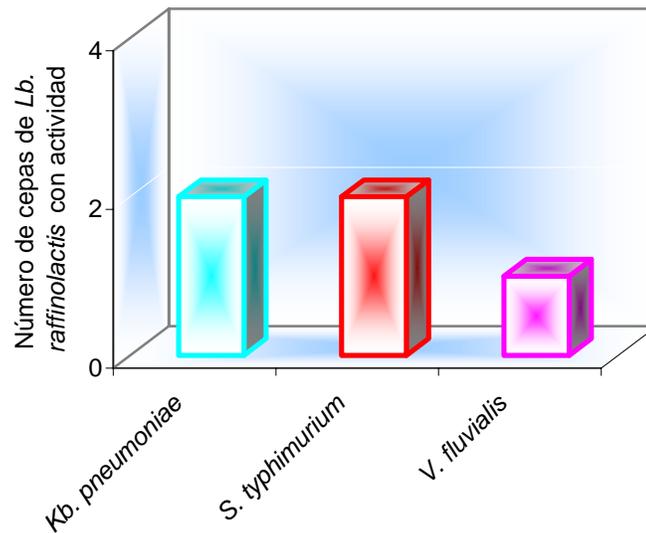
6.3.6. *Lactococcus raffinolactis* y *Lactobacillus rhamnosus*

Solo una cepa de *L. rhamnosus*, presentó actividad inhibitoria contra las cepas de las dos especies de *Vibrio* que se utilizaron en este trabajo, la información se muestra en la figura 14.

Figura 14. Actividad inhibitoria de *Lb. rhamnosus* frente a bacterias de prueba

En los reportes publicados no se encuentra mucha información a cerca de las cepas de *Lc. raffinolactis* y *Lb. rhamnosus*, lo anterior se puede deber a que el espectro de acción de los metabolitos producidos por estas cepas aun no ha sido lo suficientemente investigado o bien que no sea tan amplio como el de las otras especies identificadas, aunque pudiera ser de utilidad para la industria donde se utilizan estas cepas de BAL como cultivos iniciadores y que además retarden el deterioro causado por bacterias.

En el caso de las cepas de BAL identificadas como *Lb. raffinolactis* solo dos cepas presentaron actividad inhibitoria contra bacterias Gram negativas como *S. typhimurium*, *Kb. pneumoniae* y una contra *V. fluvialis*, esta información se presenta en la figura 15.

Figura 15. Actividad inhibitoria de *Lb. raffinolactis* frente a bacterias de prueba

Una alternativa para el uso de estas cepas que no presentan un espectro de inhibición amplio puede ser la combinación de otros metabolitos que tengan un mejor efecto de inhibición. Ya que generalmente los compuestos constitutivos no se encuentran en suficiente concentración para permitir una preservación confiable de los alimentos

Los progresos en el conocimiento de los mecanismos de inhibición, en particular a nivel de las condiciones que permita su manifestación, permitirá aumentar su uso como agentes de conservación de los productos alimenticios, debido a que los factores inhibidores dependen de la naturaleza de las cepas contaminantes a inhibir, proporciones relativas de las bacterias presentes y las condiciones de cultivo. El fenómeno de inhibición puede incluir uno o muchos mecanismos como: la competencia nutricional, cambios físico-químicos del medio (pH, formación de agentes reductores) y formación de productos antimicrobianos (ácido orgánicos, H_2O_2 y bacteriocinas).

Las cepas de BAL no mostraron actividad contra *P. mirabilis* esto se puede atribuir a la cantidad de metabolitos producidos por las cepas de BAL no fue suficiente para inhibir a esta bacteria.

Los resultados más sobresalientes de este trabajo radican en identificar las cepas de BAL que presentan actividad inhibitoria contra bacterias patógenas que al estar presentes en los alimentos pueden originar un problema de salud pública. El deterioro de los alimentos también es un problema para la industria alimenticia por lo que el crear una alternativa de origen natural que retarden el deterioro resulta una buena opción, aunque para esto es necesario realizar más estudios para caracterizar debidamente los metabolitos producidos por las BAL.

7. CONCLUSIONES

1. De las 280 cepas de BAL aisladas a partir de los productos lácteos el 19.64% presentó actividad inhibitoria frente a una o más bacterias de prueba utilizadas.
2. Las cepas con mayor actividad corresponden a las aisladas a partir de leche y queso blanco.
3. Las cepas de BAL que mostraron con mayor actividad inhibitoria fueron *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lc. raffinolactis* y *Lc. lactis* subsp *lactis*.
4. Las bacterias de prueba más sensibles a la actividad de los metabolitos producidos por las BAL fueron *V. fluvialis* y *V. parahaemolyticus*.
5. *P. mirabilis* no mostró sensibilidad a ninguna de las cepas de BAL aisladas de los productos lácteos.
6. Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación son de importancia ya que las bacterias de prueba utilizadas para demostrar la actividad inhibitoria de las BAL repercuten de manera significativa en la salud pública y en el deterioro de los alimentos.
7. Se creó un banco de cepas con actividad bacteriocinogénica para dar continuidad a estudios donde se identifique los metabolitos responsables de la inhibición de las bacterias de prueba.
8. El impacto de este trabajo es importante ya que la actividad antimicrobiana de los metabolitos producidos por las cepas de BAL podrían utilizarse como un conservador potencial para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y/o deterioradoras de los alimentos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, M.R. y Moss, M.O. 1997. Agentes bacterianos de enfermedad transmitida por los alimentos. Microbiología de los alimentos. (Eds). Acribia, S.A. Zaragoza España.

Amador, L.R., Rendon E.E. y Montaña R.R. 1993. Manual de laboratorio de Microbiología Sanitaria. 2ª edición. IPN. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Depto. De Microbiología.

Amores, R., Calvo, J.R., Maestre y Martínez, H.D. 2004. *Revista Española de Quimioterapia*. Proas Science, S.A. Vol. 17 (No. 2) 131-139

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.

Arqués, J.L., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M., Guamis, B. y Nuñez, M. 2004. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 98, 254-260.

Beliard, E. y Thuault, D. 1988. Propiedades antimicrobianas de las bacterias lácticas. En: *Microbiología alimentaria. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria* Vol I. (Eds). Acribia S.A. Zaragoza España pp: 309-316.

Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, L.C., Delboni, R.R. y Oliveira de J. 2004. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Brazilian Journal of Microbiology* 35:137-144

Charumati, M. y Lambert, J. 1996. Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pacific Journal Clinic Nutrition* 5: 20-24.

Clavel, M.M. 2006. Condiciones microbiológicas y aislamiento de bacterias ácido lácticas en quesos artesanales del Estado de Hidalgo. Tesis de licenciatura en Química en Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Daba, H., Pandiasn, S., Gosselin, J.F., Simard, R.E., Huang, J. y Lacroix, C. 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Applend and Environmental Microbiology* pp. 3450-3455.

Dalsgaard, A. 1998. The occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp. and *Salmonella* in aquaculture. *International Journal of Food Science and Technology* 33: 127-138.

Davidson, P.M. y Hoover, D.G. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: *Lactic Acid Bacteria*, Salminen, S. y von Wright, A. (Eds) Marcel Dekker, Nueva York.

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* 32:32-37.

Estrada, M.A.C.,Gutiérrez, R.L.A y Montoya, C.I.O. 2005. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín* 58 (1) pp. 2601-2609.

Fernández, E.E. 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos. 1ª Edición Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Fuller, R. 1992. Probiotics. The scientific basis. Historiy and development of probiotics. (Eds). Chapman y Hall.

González, F.T. y Zamudio, M.M. 2004. Evaluación de la actividad probiótica *in vitro* de bacterias lácticas aisladas de alimentos tradicionales de Yucatán, Universidad Autónoma de Yucatán. México.

González, M.B.E., Gómez, T.M. y Jiménez, S.Z. 2003. Bacteriocinas de Probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición* 4:10-20

Hernández, D., Cardell, E. y Zárate, V. 2004. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal Applied Microbiology* 99, 77-84.

Hoover, D.G. y Steenson, L.R. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria. (Eds). Academic Press, San Diego California.

Jay, J.M. 2000. Microbiología Moderna de los Alimentos, 4ª Edición. (Eds). Acribia, Zaragoza España.

Juneja, K.V., Sofos N.J. 2002. Control of microorganisms with chemicals: En *Control of foodborne microorganisms*. (Eds). Marcel Dekker. pp. 166-172

Klaenhammer, T.H. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie* 70:337-349.

Leveau, J.Y. y Bouix, M. 2000. Taxonomía y ecología: Los diferentes géneros de bacterias lácticas. Microbiología industrial. Los microorganismos de interés industrial. (Eds). Acribia, Zaragoza España. pp: 167-206.

Lewus, C.B. y Montville, T.J. 1991. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 13, 145-150.

Ligocka, A. y Paluszak, Z. 2004. Capability of lactic acid bacteria to inhibit pathogens in sewage sludge subjected to biotechnological processes. Departamente of Microbiology, University of Technology an Agriculture. *Bull Vet Inst Pulawy* 49, 23-27.

Meza, G.J.C. 1999. Preservación de la inocuidad microbiana del requesón mediante la incorporación de bacterias lácticas seleccionadas. Tesis de maestría

en ciencia y tecnología de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Motlagh, A.M. Johnson, M.C. y Ray, B. (1991) Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites, *Journal Food Protection*, 54:873-878.

Murry, A.C., Hinton, A. y Morrison, H. 2004. Inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridia perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Poultry Science* 3 (9): 603-607.

NOM-121-SSA1-1994. Quesos frescos madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios de la Secretaría de Salud, 1999.

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. y Onilude, A.A. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (7), pp. 179-184.

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.

Ortiz, B.M. 2006. Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos. Tesis de licenciatura en Química en Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Pereda, A.A., Vega, A.L.S. y Mota de la Garza, L. 1990. Identificación de bacterias lácticas de interés industrial mediante micrométodos. *Rev. Lat-amer. Microbiology* 32:24-29.

Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. (1999) Microbiología. 4ª edición. (Eds). Mc Graw Hill Interamericana, Zaragoza España pp. 955-957.

Roberts, T.A., Pitt, J.I., Grau, F.H. y Farkas, J. 2001. Microorganismos de los alimentos 6, Ecología microbiana de los productos alimenticios. (Eds). Acribia S. A. Zaragoza España.

Schöbitz, R., Marín, M., Horzella, M. y Carrasco, E. 2001. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Austral de Chile, Casilla: 47, Valdivia, Chile.

Soomro, A.H., Masud T. y Anwaar, K. 2004, Role of Lactic Acid Bacteria (LAB). En: *Food Preservation and Human Health—A Review. Pakistan Journal of Nutrition* 1(1): 20-24.

Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A. y Klaenhammer, T.R. 1992. Nisin treatment for inactivation of *Salmonelle* species and other Gram negative bacterial. *Appl. Environmental microbiology* 57, 3613-3615

Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoeck*. 70:331-345.

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.

Tood, E.C.D. 2001. Epidemiology and globalization of foodborne disease. En: *Guide to foodborne pathogens*, Labbé, R.G. y Garcia, S. (Eds). Wiley-Interscience.

Torres, V.M.R. 2002. Agentes Patógenos Transmitidos por los Alimentos. Vol. I Universidad de Guadalajara. México.

Turgay, E.O., Cetil O. y Ergün O. 2002. A study on metabolic and antimicrobial activities of *Pediococcus pentosaceus* isolated from fermented sausage. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5 (5), 594-596.

Veisseyre, R. 1990. Lactología técnica, 3ª Edición. (Eds). Acribia S.A. Zaragoza España.

Wood, B.J.B. y Holzapfel, W.H. 1995. The genera of lactic acid bacteria. 1ª Edición. (Eds). Blackie Academic & Profesional Vol. 2. pp:1-12

Zamora, R.L.M. 2003. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre dematadero. Tesis Doctoral. Universidad de Girona. Instituto de Tecnología Alimentaria.