

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS  
LÁCTICAS PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS  
PRESENTES EN QUESO QUE SE ELABORAN Y  
COMERCIALIZAN EN LA PROVINCIA DE  
HUAROCHIRI, DEPARTAMENTO DE LIMA”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Giovanni Anthony Pulido Gonzales

Lima -Perú

2013

*DEDICATORIA:*

A mi padre, Geovani, amigo y compañero en las buenas y en las malas, quien gracias a su apoyo incondicional pude lograr culminar este trabajo, a mi madre Mirtha inagotable fuente de amor e incansable motor de mis aciertos, a mis abuelitos Santiago y Dora quien desde el cielo guían mis pasos día a día.

Dedico esta Tesis, a ustedes, quienes día a día me dieron fortaleza, amor, comprensión y apoyo, porque estuvieron siempre a mi lado y me enseñaron que no debo rendirme ante los tropiezos y equivocaciones; y que puedo dar lo mejor de mí.

*AGRADECIMIENTOS:*

Primero darle gracias a Dios, por permitirme terminar una etapa más de mi vida.

A mi asesor, Lic. Juan Carlos Ramos Gorbeña, por su atinada dirección y por haberme brindado las facilidades técnicas, el apoyo constante y el seguimiento permanente, sin ello no hubiera sido posible el desarrollo de esta Tesis.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, y en ella a sus abnegados docentes, cada uno de los cuales deja en mi persona un imborrable recuerdo.

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	4
ÍNDICE DE TABLAS .....	6
ÍNDICE DE FIGURAS E IMÁGENES .....	7
RESUMEN.....	9
ABSTRACT .....	10
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
1.1 MARCO TEÓRICO .....	12
1.1.1 BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS .....	12
1.1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS.....	15
1.1.3 METABOLISMO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS (BAL).....	17
1.1.4 RUTAS PRINCIPALES DE FERMENTACIÓN.....	18
1.1.5 BACTERIOCINAS .....	20
1.1.5.1 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS .....	21
1.1.5.2 CLASIFICACION .....	25
1.1.5.3 MODO DE ACCIÓN.....	29
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>33</b>
<b>III. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>39</b>
3.1 MATERIALES:.....	39
3.2 METODOLOGÍA: .....	40
3.2.1 <i>Recolección de las muestras.</i> .....	40
3.2.2 <i>Aislamiento y preselección de las bacterias lácticas (BAL) de queso elaborado artesanalmente.</i> .....	40
3.2.3 <i>Bacterias Lácticas (BAL) preseleccionadas en Agar MRS.</i> .....	41
3.2.4 <i>Obtención de la bacteriocina de las Bacterias Lácticas (BAL)</i> .....	41
3.2.5 <i>Estudio de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas por el Método de Difusión en Agar en Pocillos.</i> .....	42
3.2.6 <i>Comparación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas con disco de antibiótico.</i> .....	43

<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
4.1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL SOBRENADANTE DE LAS CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) ...	47
4.2 MEDIANTE EL MÉTODO RÁPIDO DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA API 50CH BIOMÉRIEUX SE IDENTIFICARON LAS SIGUIENTES BACTERIAS LÁCTICAS (BAL).....	50
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
<b>IX. ANEXOS.....</b>	<b>68</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1. MICROORGANISMOS PATÓGENOS INDICADORES.....	42
TABLA N° 2. ANTIBIÓTICO PATRÓN.....	43
TABLA N° 3. COMPOSICIÓN DE LA GALERÍA API 50 CH.....	45
TABLA N° 4. ....	47
TABLA V. BACTERIAS LÁCTICAS.....	50

# ÍNDICE DE FIGURAS E IMÁGENES

<b>FIGURA 1.</b> RUTAS DE FERMENTACIÓN DE LAS BAL. FUENTE: (HERNÁNDEZ, A. 2009).....	19
<b>FIGURA Nº 2.</b> MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS POR LA FORMACIÓN DE POROS EN LA MEMBRANA BACTERIANA. FUENTE: (HERNÁNDEZ, A., 2009.; RUIZ-LARREA, F, ET AL. 2006. & MOLL, ET AL. 1999).....	31
<b>GRÁFICO Nº 1:</b> PORCENTAJE DE ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LAS CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS FRENTE A LAS BACTERIAS PATÓGENAS INDICADORAS. ....	68
<b>GRÁFICO Nº 2:</b> DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN FORMADO POR LA CEPA P06 FRENTE A LAS BACTERIAS PATÓGENAS INDICADORAS.....	68
<b>GRÁFICO Nº 3:</b> DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN FORMADO POR EL CONTROL DE ANTIBIÓTICO FRENTE A LAS BACTERIAS PATÓGENAS INDICADORAS. ....	69
<b>GRÁFICO Nº 4:</b> DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN FORMADO POR LA CEPA UM18 FRENTE A LAS BACTERIAS PATÓGENAS INDICADORAS.....	69
<b>GRÁFICO Nº 5:</b> DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN FORMADO POR LA CEPA U16 FRENTE A LAS BACTERIAS PATÓGENAS INDICADORAS.....	70
<b>GRÁFICO Nº 6:</b> DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN FORMADO POR LA CEPA U14 FRENTE A LAS BACTERIAS PATÓGENAS INDICADORAS.....	70
<b>GRÁFICO Nº 7:</b> DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN FORMADO POR LA CEPA HM38 FRENTE A LAS BACTERIAS PATÓGENAS INDICADORAS.....	71
<b>GRÁFICO Nº 8:</b> DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN FORMADO POR LA CEPA HM39 FRENTE A LAS BACTERIAS PATÓGENAS INDICADORAS.....	71
<b>FIG. Nº 1:</b> CEPAS DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS EN AGAR MRS.....	73
<b>FIG. Nº 3:</b> CEPAS DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS INDICADORES <i>PSEUDOMONA AERUGINOSA</i> , <i>E. COLI</i> , <i>S. AUREUS</i> Y <i>S. PYOGENES</i> .....	75
<b>FIG. Nº 4:</b> HALOS DE INHIBICIÓN FRENTE A <i>S. AUREUS</i> PRODUCIDOS POR CEPAS DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS AISLADAS DE QUESOS PROVENIENTES DE LA PROVINCIA DE HUAROCHIRÍ (MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR). SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS NEUTRALIZADOS A PH 6.5 DE A: CEPA UM 18; B: CEPA HM 39; C: CEPA HM 38 Y D: CEPA P06.....	76
<b>FIG. Nº 5:</b> HALOS DE INHIBICIÓN FRENTE A <i>S. PYOGENES</i> PRODUCIDOS POR CEPAS DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS AISLADAS DE QUESOS PROVENIENTES DE LA PROVINCIA DE HUAROCHIRÍ (MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR). SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS NEUTRALIZADOS A PH 6.5 DE A: CEPA UM 18; B: CEPA HM 38 Y C: CEPA P06 .....	77

<b>FIG. Nº 6:</b> HALOS DE INHIBICIÓN FRENTE A <i>E. COLI</i> PRODUCIDOS POR CEPAS DE <i>BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS</i> AISLADAS DE QUESOS PROVENIENTES DE LA PROVINCIA DE HUAROCHIRÍ (MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR). SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS NEUTRALIZADOS A PH 6.5 DE A: CEPA UM 18; B: CEPA U 14 Y C: CEPA P06. ....	78
<b>FIG. Nº 7:</b> HALOS DE INHIBICIÓN FRENTE A <i>P. AERUGINOSA</i> PRODUCIDOS POR CEPAS DE <i>BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS</i> AISLADAS DE QUESOS PROVENIENTES DE LA PROVINCIA DE HUAROCHIRÍ (MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR). SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS NEUTRALIZADOS A PH 6.5 DE A: CEPA UM 18; B: CEPA HM 39; C: CEPA U 14 Y D: CEPA P06.....	79
<b>FIG. Nº 8:</b> HALOS DE INHIBICIÓN FRENTE A <i>P. AERUGINOSA</i> Y <i>E. COLI</i> PRODUCIDOS POR CEPAS DE <i>BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS</i> AISLADAS DE QUESOS PROVENIENTES DE LA PROVINCIA DE HUAROCHIRÍ (MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR). SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS NEUTRALIZADOS A PH 6.5 DE A: CEPA U16; B: CEPA P05 .....	80
<b>FIG. Nº 9:</b> KIT API 50CH– BIOMÉRIEUX Y API 50CH MEDIUM, PARA LA IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) .....	81
<b>FIG. Nº 10:</b> AMPOLLA API 50 CHL MEDIUM .....	81
<b>FIG. Nº 11:</b> GALERÍA API 50CH COMPUESTA POR 50 MICROTUBOS LOS CUALES PERMITIERON EL ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN DE SUBSTRATO Y LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL). ....	82
<b>FIG. Nº 12:</b> CEPA U14 IDENTIFICADA COMO <i>LACTOCOCCUS LACTIS SSP HORDNIAE</i> INCUBADA A 37 °C DURANTE 24H.....	83
<b>FIG. Nº 13:</b> CEPA HM 39 IDENTIFICADA COMO <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> INCUBADA A 37 °C DURANTE 24H.....	84
<b>FIG. Nº 14:</b> CEPA P06 IDENTIFICADA COMO <i>LACTOBACILLUS CURVATUS SSP CURVATUS</i> , INCUBADA A 37 °C DURANTE 24H. ....	85
<b>FIG. Nº 15:</b> CEPA P05 IDENTIFICADA COMO <i>LACTOBACILLUS HELVETICUS</i> INCUBADA A 37 °C DURANTE 24H.86	86
<b>FIG. Nº 16:</b> CEPA U16 IDENTIFICADA COMO <i>LACTOBACILLUS PARACASEI SSP PARACASEI</i> , INCUBADA A 37 °C DURANTE 24H .....	87
<b>FIG. Nº 17:</b> CEPA UM18 IDENTIFICADA COMO <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> INCUBADA A 37 °C DURANTE 24H.....	88
<b>FIG. Nº 18:</b> CEPA HM 38 IDENTIFICADA COMO <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i> INCUBADA A 37 °C DURANTE 24H..	89

## RESUMEN

Se recolectó un total de 50 muestras de quesos frescos (20 kg) provenientes de la Provincia de Huarochirí, con la finalidad de obtener bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas, de donde se aislaron 100 cepas, mediante el método de difusión en Agar en pocillos, el sobrenadante que presentó mayor actividad antimicrobiana frente a los microorganismos patógenos indicadores *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Las cepas P06 y UM18 presentaron un 24% de actividad; la cepa U16 un 15% de actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; las cepas correspondientes U14, HM38 y HM39 presentaron 10% de actividad bactericida frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* y *S. pyogenes*; y finalmente la cepa P05 fue la que presentó menor actividad bactericida con un 7% frente a *Escherichia coli*. Las 7 cepas aisladas produjeron un halo de inhibición frente a los microorganismos patógenos indicadores, de las cuales las cepas P06 y UM18 produjeron un mayor halo de inhibición frente a *Pseudomonas aeruginosa* con un diámetro correspondiente a 21mm y 20mm. En comparación con el control de antibiótico que produjo un halo de inhibición de 26mm de diámetro frente a *Pseudomonas aeruginosa*. La identificación de las especies de bacterias ácido lácticas se realizó mediante el método rápido de identificación bioquímica API50 CH BIOMÉRIEUX, las especies identificadas fueron: *Lactobacillus curvatus* ssp *curvatus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei*, *Lactococcus lactis* ssp *hordniae*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus helveticus*.

Palabras clave: bacterias ácido lácticas, bacteriocinas, *Lactobacillus*, api 50 CH, actividad bactericida, halo de inhibición, quesos frescos

## ABSTRACT

There were a total of 50 samples of fresh cheeses (20 kg) from the Province of Huarochiri, in order to obtain lactic acid bacteria producing bacteriocins, of which 100 strains were isolated by the agar diffusion method in wells, the supernatant which showed higher antimicrobial activity against pathogenic microorganism's indicators *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. P06 and UM18 strains showed a 24% activity; un15% strain U16 activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains corresponding U14, HM38 and HM39 10% showed bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*, and finally the strain P05 was the one with lower bactericidal activity with 7% against *Escherichia coli*. Asylee the 7 strains produced a halo of inhibition against pathogens indicators, which strains and UM18 P06 produced a greater inhibition zone against *Pseudomonas aeruginosa* with a diameter corresponding to 21mm and 20mm. Compared with the control of antibiotic that caused an inhibition of front diameter 26mm *Pseudomonas aeruginosa*. The identification of lactic acid bacteria species was performed by rapid biochemical identification method API50 CH BIOMÉRIEUX; identified species were *Lactobacillus curvatus* ssp. *curvatus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* ssp *hordniae* *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus helveticus*.

Keywords: lactic acid bacteria bacteriocins, *Lactobacillus*, API 50 CH, bactericidal activity, inhibition halo, fresh cheeses

# I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas constituyen un grupo de microorganismos que han sido utilizados en la industria alimentaria de una gran variedad de alimentos fermentados y elaborados de forma artesanal, como queso, yogurt, masato, vino y chicha de jora.

La elaboración de derivados lácteos ha sido y es en la actualidad uno de los procesos de transformación fermentativa de la leche fresca practicada desde hace cientos de años por el hombre para evitar así la pérdida del mismo, obteniendo un producto con un mayor tiempo de vida útil.

En los diferentes departamentos del Perú este proceso se lleva a cabo de una manera artesanal utilizando bacterias lácticas nativas y como resultado de este proceso de transformación fermentativa se obtienen quesos frescos con características organolépticas variadas dependiendo del tipo de bacteria láctica que este participando en dicho proceso fermentativo, el tiempo de vida del producto es mayor debido a la presencia del ácido láctico y sus bacteriocinas que inhiben el crecimiento bacteriano de los microorganismos deterioradores de los alimentos.

La tecnificación de la industria alimentaria y la modernización de los métodos microbiológicos de análisis para el control de la calidad de los alimentos, permiten una identificación más rápida y precisa de estas bacterias lácticas y de los microorganismos deterioradores de los alimentos presentes en el queso fresco.

En la actualidad la resistencia bacteriana y el adecuado control de la calidad de los alimentos han hecho que se busquen nuevas alternativas antibacteriana de distinto origen, una alternativa actual es el uso de bacterias lácticas y sus bacteriocinas como agentes protectores de los alimentos frente a posibles fuentes de contaminación producido por una inadecuada fabricación y/o manipulación de los alimentos.

Las bacteriocinas son sustancias proteicas con actividad antibacteriana. Las bacteriocinas son termo resistentes, activos a pH bajo, inocuas para los consumidores y estables en los alimentos, son utilizados como bioconservantes naturales en la industria alimentaria.

El objetivo de la presente investigación es aislar e identificar a las bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas presentes en queso fresco que se comercializan en la provincia de Huarochirí, departamento de Lima.

## **1.1 MARCO TEÓRICO**

### **1.1.1 BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS**

Las bacterias lácticas como un grupo de microorganismos de gran importancia desde el punto de vista aplicado, ya que son los componentes fundamentales de muchos de los cultivos iniciadores utilizados en la industria alimentaria. Desde hace mucho tiempo, se ha reconocido la importancia de las bacterias ácido lácticas (BAL) como microorganismos benéficos en los alimentos y en la salud,

mejora el tracto gastrointestinal de los seres humanos, evitando el desarrollo de microorganismos patógenos capaces de producir enfermedades, por la estimulación del sistema inmunológico y por lo tanto, la producción de anticuerpos. (Martin del Campo M., *et al.* 2008)

Cristóbal, R. 2008. En su investigación menciona que el uso más común de las bacterias ácido lácticas está relacionado con la producción de queso, yogurt, crema de leche y mantequilla. Las cuales comprenden un grupo de bacterias benignas que como producto final de su fermentación tienen al ácido láctico. Sus aplicaciones más conocidas están relacionadas con la industria láctea pero también pueden presentar otros usos como en el curado de la carne, pescado y embutidos. (Ratto, M. 1983.; ICMSF. 1985 & Cristóbal, R. 2008).

Las bacterias ácido lácticas transforman la lactosa de la leche en ácido láctico, el que provoca cambios en la estructura de las proteínas. De esta manera se modifica la textura del producto, pero existen otras variables, como la temperatura y la composición de la leche, que influyen en las cualidades de los distintos productos resultantes. El ácido láctico le confiere a la leche fermentada ese sabor ligeramente acidulado, y otros derivados de la fermentación producen a menudo otros sabores o aromas (Ratto, M. 1983.; ICMSF. 1985 & Cristóbal, R. 2008).

Las bacterias ácido lácticas tienen una amplia aplicación como cultivos iniciadores en una variedad de alimentos fermentados. Los ácidos orgánicos producidos, con una

reducción en el pH, se considera como el principal agente inhibidor del crecimiento de microorganismos contaminantes en los alimentos fermentados (Carrasco, M., *et al.* 2002 & Martín del Campo M, *et al.* 2008).

Martin del Campo M, *et al.* 2008. Dice que las BAL se han utilizado desde hace algunas décadas en la industria de alimentos como bioconservadores debido a la producción de sustancias que ejercen acción antibacteriana, que contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos y evitan el desarrollo de microorganismos patógenos. Otras características deseables de las BAL, son que pueden mejorar el sabor y la textura y en algunos casos aumentan el valor nutricional, por sus efectos sobre la digestibilidad (Campos, J. 2002 & Nes, I, *et al.* 2004). Debido a que las bacterias ácido lácticas pueden ser destruidas en el tracto intestinal, son termo resistentes, activas en pH bajos, inocuas para los consumidores y estables en los alimentos, se han utilizado como un bioconservador natural en los alimentos (Vanderbergh, P. 1993).

Las bacterias ácido lácticas tienen actualmente un gran potencial biotecnológico en la producción de alimentos destinados al consumo humano y animal. No sólo contribuyen al desarrollo de características organolépticas de los alimentos, sino que sirven para el control de la proliferación de microorganismos patógenos debido a que producen bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, ácido láctico y otras sustancias. Entre éstas, se ha comprobado que los lactobacilos son beneficiosos

para la salud humana y animal, por tal motivo estas bacterias pueden ser usadas en la conservación de ciertos alimentos usando las bacteriocinas como antimicrobianos (Samaniego, L, *et al.* 2000 & Cristóbal, R. 2008)

### **1.1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) forman un grupo natural de bacterias Grampositivas, anaerobias aerotolerantes, normalmente no móviles, no formadoras de esporas, catalasa negativas, (algunas cepas presentan una pseudocatalasa), con morfología de coco, coco-bacilo o bacilo (con la sola excepción del género *Sporolactobacillus* (Müller, D. 2006) que fermentan carbohidratos para formar principalmente ácido láctico (Fox, *et al.* 2000) como resultado del metabolismo de los hidratos de carbono (Eck, 1990, Stanley, 1998; Fox, *et al.* 2000.; Hassan y Frank, 2001 & Suarez, J.C. 2008)

Martinez, B. 1996. La mayoría de las bacterias ácido lácticas sólo pueden obtener energía a partir de azúcares y otros compuestos relacionados. Debido a su limitada capacidad biosintética son muy exigentes nutricionalmente y requieren factores de crecimiento complejos como aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Dellaglio, *et al.* 1994). Las bacterias lácticas requieren de aminoácidos específicos, vitaminas B y otros factores de crecimiento, y son incapaces de utilizar hidratos de carbono complejos (Stanley, 1998.; Hassan y Frank, 2001& Suarez, J.C. 2008.).

Revisiones taxonómicas recientes sugieren que las bacterias del ácido láctico forman un grupo heterogéneo y comprenden los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Sporolactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Sin embargo los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* conforman el corazón del grupo de bacterias del ácido láctico, y son los comúnmente aceptados como integrantes de este grupo por la gran mayoría de los especialistas. (Fox, *et al.* 2000.; Müller, D. 2006. & Axelsson, 2006).

La clasificación de las bacterias ácido lácticas (BAL), está basado principalmente en la morfología, en el modo de fermentación de la glucosa (homolácticas o heterolácticas), clase de carbohidratos que fermenta, crecimiento a diferentes temperaturas (mesófilas o termófilas), configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a altas concentraciones de sal (halotolerantes y no halotolerantes), tolerante a condiciones ácidas y alcalinas. Otras características utilizadas en la clasificación de las BAL son las hidrólisis de arginina, formación de acetoína, tolerancia a bilis, tipo de hemólisis, requerimientos de factores de crecimiento, presencia de ciertas enzimas ( $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucoronidasa), características de crecimiento en la leche, y tipificación serológica. También se incluyen enfoques quimiotaxonómicos y moleculares, tales como

composición de ácidos grasos y constituyentes de la pared celular son también usados en la clasificación, porcentaje de G+C en el DNA y movilidad electroforética de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Eck, 1990; Axelsson, 1993; Vandamme y *et al.* 1996; Fox, *et. al.* 2000; Axelsson, 2006 & Hernández, A. 2009).

### **1.1.3 METABOLISMO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS (BAL)**

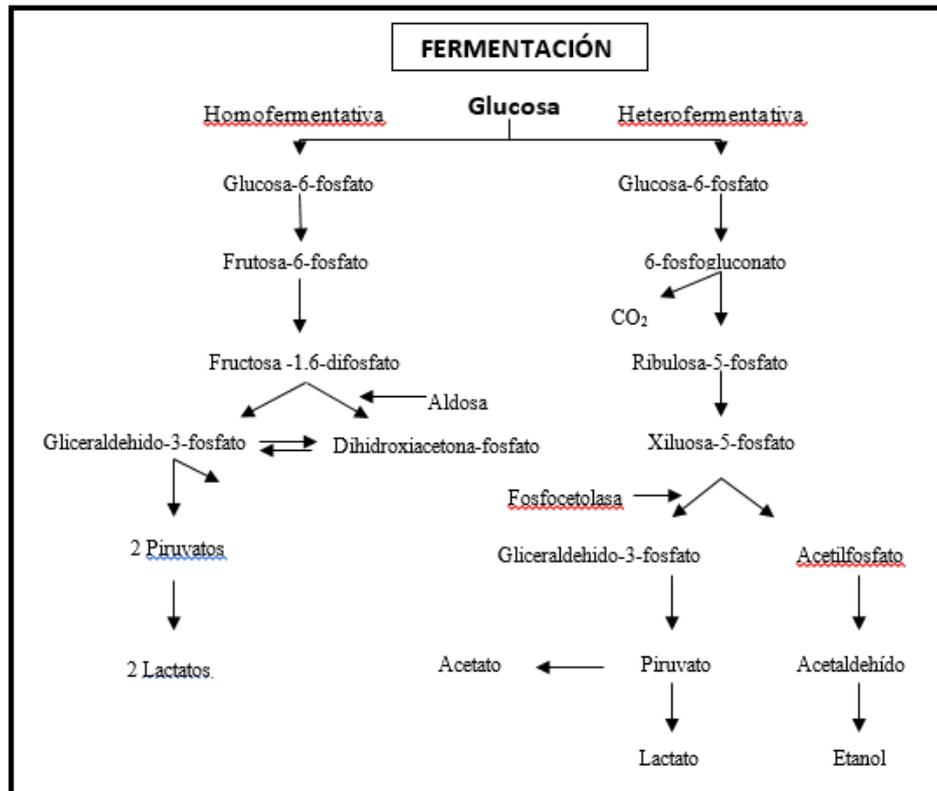
Hernández, A. en 2009 dice que la característica esencial del metabolismo de las BAL es la eficiencia de fermentación de carbohidratos, la generación de Trifosfato de Adenosina (ATP), es subsecuentemente usado para propósitos biosintéticos, además de la enorme capacidad para degradar diferentes carbohidratos y compuestos relacionados. Generalmente el producto final predominante es por supuesto el ácido láctico. Sin embargo, las BAL se adaptan de acuerdo a varias condiciones y cambian su metabolismo esto puede llevar a los diferentes productos finales de fermentación. Los niveles y proporciones de los productos finales de la fermentación que se acumulan dependen de las especies de BAL involucradas, la composición química del ambiente de cultivo y las condiciones físicas que hay durante el proceso fermentativo (Vandamme, *et al.* 1996; Axelsson, 2006).

#### 1.1.4 RUTAS PRINCIPALES DE FERMENTACIÓN

Dos rutas de fermentación del azúcar (Fig. 1) pueden ser distinguidas en las bacterias ácido lácticas

Que a continuación se mencionan:

- **Fermentación Homoláctica:** También llamada Glucólisis (rutas Embden- Meyerhoft) resultando casi exclusivamente en ácido láctico como el producto final, (vía glicolítica o de Embden-Meyerhof-Parnas): *Lactococos, Pediococos, Streptococos, Lactobacilos* homofermentadores. Metabolizan las hexosas principalmente a ácido láctico, con un rendimiento neto de dos moles de ATP por mol de hexosa fermentado.
- **Fermentación Heteroláctica:** Esta fermentación es por medio de la enzima 6-fosfogluconato/fosfocetolasa dando como resultado cantidades significativas de otros productos finales tales como etanol, acetato y CO<sub>2</sub> además del ácido láctico (*Leuconostocs, Latobacilos* heterofermentadores). En la fermentación de hexosas, el ácido láctico comprende el 70% de los productos catabólicos finales, junto con cantidades equimolares de CO<sub>2</sub> y acetato o etanol. El rendimiento neto es de un mol de ATP por mol de hexosa (Vandamme, *et al.* 1996).



**Figura 1.** Rutas de fermentación de las BAL. Fuente: (Hernández, A. 2009)

Ouwehand y Vesterlund en 2004 y Ogunbanwo, *et al.* 2003 los productos finales de la fermentación de las BAL de más interés en la industria alimenticia son ácidos orgánicos, dióxido de carbono, diacetilo, y las bacteriocinas. Además de la producción de metabolitos primarios, se pueden formar otros compuestos antimicrobianos por las diferentes BAL

### 1.1.5 BACTERIOCINAS

Müller, D. 2006, en su investigación cita a Gratia, A (1925) quien señala que la aplicación en seguridad microbiológica alimentaria de péptidos antimicrobianos producidos por bacterias ha experimentado un extraordinario avance en los últimos años, siendo estos identificados y caracterizados en diversos péptidos antimicrobianos denominados bacteriocinas, los cuales en su mayoría son producidos por bacterias ácido lácticas (Cintas, L, *et al.* 2000 & Cristóbal, R. 2008).

Este interés marcado sobre las bacteriocinas se debe a un conjunto de hechos, como la aprobación de la nisina como sustancia GRAS (Generally Reconized as Safe) por la Administración de Alimentos y Drogas de EE. UU. en ciertos alimentos y el reconocimiento de que la mayoría de enfermedades asociadas al consumo de alimentos pueden ser atribuidas directamente a infecciones o intoxicaciones microbianas (Cintas, L, *et al.* 2000 & Cristóbal, R. 2008).

Las bacteriocinas poseen un gran potencial para utilizarse en sistemas de alimentos para la inhibición natural de microorganismos patógenos. Esta biotecnología puede ser implementada relativamente a bajo costo para la conservación de una amplia variedad de alimentos (Hoover, D.G. & Stenson, L.R. 1993.). El aumento en el consumo de alimentos procesados que se elaboran con

conservantes químicos, ha originado en los consumidores una demanda por alimentos con un mínimo procesamiento y que tiendan a ser más naturales. Como resultado de este patrón en el consumo, existe un gran interés en la utilización de agentes antimicrobianos producidos naturalmente. (Cleveland, J, *et al.* 2001; Luders, T, *et al.* 2003 & Martin del Campo M, *et al.* 2008.).

Los beneficios de las bacteriocinas, en especial de los lantibióticos, en salud humana y animal, presentan varias características y ventajas que las hacen particularmente atractivas: un espectro de inhibición específico, un sistema de autorregulación, estabilidad y procesos de producción costo – efectivo y el consumo en forma segura por los humanos por muchos siglos. Actualmente, las bacteriocinas de bacterias lácticas presentan un gran interés para la bioconservación dentro de la industria alimentaria la cual se basa en las bacteriocinas producidas especialmente por el género *Lactobacillus* (Samaniego, L, *et al* 2000 & Cristóbal, R. 2008) por su potencialidad para inhibir a microorganismos patógenos y alterantes de alimentos (Yang y Ray, 1994).

#### **1.1.5.1 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS**

Müller, D. 2006 y Cristóbal, R. 2008 señalan que el término más general de "bacteriocinas" son antibióticos proteicos con actividad antimicrobiana de origen bacteriano del tipo de las colicinas.

Arqués, J. 2003 y Müller, D. 2006 indican que Gratia, 1925 describió a las colicinas de *E. coli* como las primeras bacteriocinas, quien explicó la producción de colicinas por parte de bacterias coliformes, demostrando que la clase V de *E. coli* (virulenta en infecciones experimentales) producía en el medio líquido una sustancia dializable y termoestable (luego llamada Colicina V), que inhibía a altas diluciones el desarrollo de otras especies de *E. coli*.

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas fueron inicialmente descritas por Rogers (1928) al observar la actividad antimicrobiana de *Lc. lactis* frente a *Lb. bulgaricus* debida a un compuesto proteico y termoestable. Posteriormente, Hirsch (1951) sugirió el empleo de cultivos iniciadores productores de nisina para prevenir la formación de gas por *Clostridium* en queso. (Arqués, J. 2003)

Müller, D. 2006 y Cristóbal, R. 2008 señalan que Tagg, *et al.* 1976 define a las bacteriocinas de las bacterias Gram positivas como un grupo de sustancias antimicrobianas de origen bacteriano, caracterizadas por:

1. La adsorción a receptores de membrana específicos.
2. La actividad intraespecífica.
3. La biosíntesis letal.
4. Poseer un componente proteico biológicamente activo.
5. Ejercer un modo de acción bactericida.

6. Por la localización plasmídica de los determinantes genéticos que codifican su producción e inmunidad.

Tagg *et al.* 1976 considera que los seis criterios mencionados anteriormente son válidos para las bacteriocinas prototipos o colicinas, pero las bacteriocinas de las Gram positivas muestran discordancias con algunos de los criterios establecidos, directamente en lo referente al espectro de acción, la presencia de receptores específicos, la localización de los determinantes genéticos y la biosíntesis letal. Por tanto, Tagg y colaboradores sugirieron que se deben considerar bacteriocinas a todas aquellas sustancias antimicrobianas bacterianas que, por lo menos, cumplan los criterios (4) y (5) (Casaus, M. 1998. & Cintas, L, *et al.* 2000-2001 en Cristóbal, R. 2008).

Müller, D. 2006 menciona que años después de realizada esta primera definición, Konisky en 1982 concluyó que los únicos requisitos son: tener naturaleza proteica y no ser letales para la cepa productora. Es así que Tagg en 1991 quien usó el término BLIS (sustancia inhibitoria parecida a una bacteriocina), para definir a aquellos compuestos que cumplían parcialmente con los seis criterios expuestos, fue dejado de lado actualmente. Actualmente se puede definir a las bacteriocinas como péptidos bioactivos sintetizados a nivel ribosomal, y liberados extracelularmente, que son capaces de inhibir el desarrollo de bacterias taxonómicamente cercanas a la cepa productora o a otros géneros de bacterias Gram

positivas como: *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Listeria*, entre otros. (Delves-Broughton, *et al.* 1990).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente por bacterias productoras (Sahl y Bierbaum, 1998 en Arqués, J. 2003). Las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas son un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas de origen peptídico, la mayoría no han sido bien caracterizadas aún. Por ende, no se puede establecer propiedades en común, sin embargo las propiedades que principalmente se tienen en cuenta son las siguientes: naturaleza, tamaño molecular, composición aminoacídica y estructura química, termorresistencia y estabilidad frente a pH. (Arqués, J. 2003.; Casaus, M. 1998. en Cristóbal 2008.)

Las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas se caracterizan por ser estables generalmente a valores de pH ácidos o próximos a neutro, lo que indica la adaptación de estas sustancias a condiciones ambientales de los sustratos en los que se desarrollan las bacterias productoras. La termorresistencia es una característica muy desarrollada entre las bacteriocinas de las bacterias lácticas, dependiendo de una serie de factores como el grado de purificación de las bacteriocinas, la presencia de moléculas termoprotectoras y el pH. La termoestabilidad disminuye cuando los tratamientos térmicos se realizan con las bacteriocinas purificadas parcialmente o homogéneamente, como se ha comprobado con la lactacina B, la carnocina U – 149, y la sakacina P, entre

otras. Debido a su naturaleza peptídica, las bacteriocinas pueden ser degradadas por enzimas digestivas, resultando inocuas para el hombre y su microbiota intestinal. Además, sus propiedades fisicoquímicas dan resistencia a tratamientos térmicos y debido a su pequeño tamaño pueden difundir con relativa facilidad en los alimentos. (Arqués, J. 2003 & Casaus, M. 1998 en Cristóbal, R. 2008).

Las bacteriocinas no son antibióticos ya que difieren de los antibióticos convencionales en que son proteínas y presentan un espectro inhibitorio relativamente estrecho (Riley, *et al.* 2002). Todo esto fue profundamente discutido y considerado en el año 1964 cuando la OMS aprobó el uso de la bacteriocina Nisina en los alimentos (Delves-Broughton, *et al.* 1990 en Müller, D. 2006).

#### **1.1.5.2 CLASIFICACION**

La bacteria ácido lácticas según sus propiedades físico-químicas, tamaño, espectro de inhibición y presencia de aminoácidos modificados, las bacteriocinas de las bacterias lácticas son un grupo heterogéneo constituido mayoritariamente por péptidos de pequeño tamaño, generalmente catiónicos o anfipáticos, y derivados de propéptidos con un extremo N-terminal cargado negativamente. (Nes, *et al.*, 1996; Nissen-Meyer y Nes, 1997; Moll, *et al.*, 1999). Por tal motivo Klaenhammer, en el año 1993, define cuatro clases diferentes de bacteriocinas:

## Clase I: lantibióticos

Son pequeños péptidos (< 5 kDa) los lantibióticos cuentan con un aminoácido inusual que no se encuentra normalmente en la naturaleza (ejemplo lantionina y  $\beta$ -metil lantionina), estos aminoácidos inusuales, son sintetizados por modificaciones postransduccionales (Hernández, A. 2009) por deshidratación de serina y treonina para dar dehidroalanina y dehidrobutirina, respectivamente (Martinez, B. 1996).

Los lantibióticos se dividen en dos tipos, A y B (Ia y Ib), pero Sahl, *et al.* 1998 propusieron un tercer tipo que abarcaría los lantibióticos de estructura no definida. (Arqués, J. 2003)

- Los lantibióticos Ia son alargados, flexibles, con forma de sacacorchos, anfipáticos, poseen carga neta positiva y un peso molecular comprendido entre 2 y 5 kDa. La nisina A, producida por *L. lactis*, fue el primer lantibiótico conocido (Gross y Morell, 1971) la cual pertenece al tipo A.
- Los lantibióticos tipo Ib tienen forma globular y peso molecular de aproximadamente 2 kDa. Son también fuertemente anfipáticos, pero a diferencia de los péptidos de tipo Ia carecen de carga neta o la poseen negativa (Altena, *et al.*, 2000). Hasta el momento, no se han identificado lantibióticos de tipo B dentro de las bacterias lácticas.

- El tercer tipo de antibióticos incluye aquellos para los que no existe una información completa de su estructura, aunque los genes estructurales y los implicados en la biosíntesis hayan sido secuenciados, de manera que no pueden establecerse comparaciones con las diferentes bacteriocinas ya descritas.

### **Clase II: no modificadas de pequeños tamaños y estables al calor**

Son péptidos termoestables y comprende el grupo de bacteriocinas más numeroso, de peso molecular menor a 10 kDa y sin aminoácidos modificados en su estructura. Estas bacteriocinas no sufren modificaciones postranscripcionales, contienen entre 30 y 60 aminoácidos y suelen ser catiónicas a pH neutro e hidrofóbicas y/o anfifílicas. Poseen una señal de procesamiento del péptido líder común Gly-Gly. Se subdividen en cuatro subclases: IIa o tipo pediocina, IIb o bacteriocinas de dos péptidos, IIc o secretadas por un sistema *sec*-dependiente y IId. (Arqués, J. 2003 y Müller, D. 2006)

- **Subclase IIa:** Constituyen a las bacteriocinas del tipo pediocina PA-1, que se caracterizan por presentar una fuerte actividad antilisteria, y son péptidos que presentan en su extremo N – terminal la secuencia YGNGV (Y, tirosina, G, glicina, N, asparagina y V, valina), denominada secuencia consenso. (Arqués, J. 2003 y Cristóbal, R. 2008).

- **Subclase IIb:** bacteriocinas que requieren la acción complementaria de dos péptidos catiónicos diferentes para ser activas. Dentro de este grupo de bacteriocinas destacan la lactococina M (van Belkum, *et al.*, 1991a) y la lactococina G (Nissen-Meyer, *et al.*, 1992), producidas por cepas de *L. lactis*. (Martinez, B. 1996).
- **Subclase IIIc:** Son péptidos pequeños no modificados, presentan termoestabilidad, no poseen la secuencia péptido líder Gly-Gly sino que están sintetizadas con una secuencia líder N terminal típica del tipo sec. (Arqués, J. 2003). Comprende dos subgrupos, uno con péptidos que poseen uno o dos residuos de cisteína (tiolbióticos y cistibióticos respectivamente), entre los cuales se menciona a Enterocina B y Lactococina B (Venema, *et al.*, 1993); el otro subgrupo abarca péptidos sin residuos de cisteína Lactococina A y Acidocina B (Oscariz, *et al.* 2001 y Müller, D. 2006).

### **Clase III: no modificadas, de gran tamaño y sensibles al calor**

Clase constituida por proteínas de elevado tamaño molecular (> 30 KDa) formadas por complejos terciarios de proteína con lípidos y/o glúcidos, siendo estos últimos esenciales para la actividad antimicrobiana, y termolábiles (se inactivan con tratamientos térmicos de 60 – 100°C durante 10 – 15 minutos) (Arqués, J. 2003 y Cristóbal, R.

2008). Siendo estas bacteriocinas las que menor interés industrial despiertan La mayoría de estas bacteriocinas son producidas por *Lactobacillus*, aunque recientemente se han identificado también en *Enterococcus* (Cintas, *et al.*, 2001). Entre las más representativas de este grupo tenemos a la Plantaricina B (West, *et al.*, 1988); Helveticina J y Millericina B (Beukes, *et al.* 2000).

#### **Clase IV: Bacteriocinas mixtas**

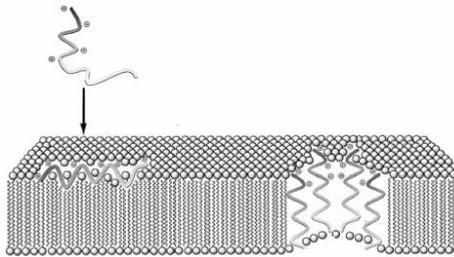
Bacteriocinas complejas, constituidas por una parte proteica y una o más fracciones lipídicas y/o glucocídicas necesarias para su actividad biológica. Como ejemplo de bacteriocinas con fracciones glucídicas podemos citar a la leucocina S y de las que poseen lípidos, las lactostrepcinas (Kozak, *et al.*, 1978). La lactocina 27 presenta una estructura aún más compleja con motivos de ambos tipos (Upreti y Hinsdil, 1973). No obstante, no se ha descrito el mecanismo molecular mediante el cual se produce la unión de los motivos no proteicos. (Martinez, B. 1996 y Cristóbal, R. 2008).

#### **1.1.5.3 MODO DE ACCIÓN**

Las bacteriocinas pueden poseer un modo de acción bactericida o bacteriostático sobre las células sensitivas, influenciado por diversos factores tales como la dosis de las bacteriocinas y el grado de purificación en condiciones experimentales como por ejemplo (temperatura, pH, presencia de agentes que rompen la integridad de la pared celular y otros compuestos antimicrobianos)

(Oppegard, *et al.* 2007), (Bruno y Montville, 1993) dicen que la mayoría de las bacteriocinas ejercen un modo de acción bactericida contra los microorganismos sensibles, aunque algunas como la Lactocina 27, Leucocina A-UAL 187 y la Leucocina S han mostrado actuar de modo bacteriostático. La actividad bactericida de las bacteriocinas puede ser acompañada por lisis de las células sensitivas (bacteriocinas bacteriolíticas) esto es el caso de la Nisina. La mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas ejercen su acción antimicrobiana desestabilizando y permeabilizando la membrana citoplasmática de las células sensibles (Bruno y Montville, 1993; Barefoot y Nettles, 1993; Rojas y Vargas, 2008).

El blanco primario de acción de las bacteriocinas parece ser en la membrana plasmática. Las bacteriocinas alteran la permeabilidad selectiva de la membrana de las células vegetativas sensibles, provocando la inmediata e inespecífica liberación de iones, compuestos de bajo peso molecular y algo más tarde del ATP intracelular. Estas alteraciones provocan la disipación completa o parcial de la fuerza protón motriz (PMF) ocasionando desórdenes metabólicos secundarios que, en último término, inhiben la generación de energía y la síntesis de macromoléculas, lo que supone la muerte celular (Monteville, *et al.*, 1995). (Fig. N° 2)



**Figura N° 2.** Mecanismo de acción de las bacteriocinas por la formación de poros en la membrana bacteriana. Fuente: (Hernández, A., 2009.; Ruiz-Larrea, F, *et al.* 2006. & Moll, *et al.* 1999)

(Martinez, B. 1996) Dice que la PMF es un gradiente electroquímico compuesto de un potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) y de un gradiente de pH ( $\Delta\text{pH}$ ), y es necesaria para llevar a cabo gran parte de los procesos dependientes de energía del metabolismo celular. Se ha observado que la nisina y otros antibióticos necesitan un estado energizado de las células para ejercer su acción (Sahl, 1991) mientras que otras, como la pediocina PA-1, leucocina S, lactacina F, plantaricina C y las lactococinas A y B (Bruno y Monteville, 1993; González, *et al.*, 1996; van Belkum, *et al.*, 1991; Venema, *et al.*, 1993), actúan independientemente de la existencia de una diferencia de potencial a ambos lados de la membrana. Por otro lado, los antibióticos no requieren un receptor proteico específico ya que actúan sobre liposomas (Kordel *et al.*, 1989). Sin embargo, algunas bacteriocinas sólo son activas frente a células enteras y/o vesículas derivadas de las mismas, por lo que sí parecen necesitar un receptor localizado en la membrana o en la pared celular (van

Belkum, *et al.*, 1991; Venema, *et al.*, 1993; Moll, *et al.*, 1996).

La formación de poros y la eliminación de la fuerza motriz protónica (fuente de energía celular) promueven la salida rápida de metabolitos de pequeño tamaño, como aminoácidos y nucleótidos, interrumpiendo los procesos de biosíntesis de la célula. Además de la formación de poros, para ciertas bacteriocinas se ha descrito la lisis celular como modo de acción secundario (Cintas, L, *et al.* 2001.; & Arqués, J. 2003).

## II. ANTECEDENTES

**Foo, et al. 1993.** Describen al género *Lactobacillus*, como bacterias comprendidas en forma bacilar de 0,5 – 1,2 x 1,0 – 10,0 µm: comúnmente asociadas en cadenas cortas, son anaerobias facultativas o microaerófilas, catalasa y citocromo negativos. Excepcionalmente pueden poseer motilidad por flagelos peritricos, son autótrofos, quimioorganotróficos, necesitan medios complejos para su crecimiento. Degradan la sacarosa para producir lactato. Su temperatura optima de crecimiento está entre 30 – 40 °C.

**Vignolo, G. 1996.** En un estudio realizado sobre la inhibición de *Listeria monocytogenes* en carne mediante la producción de lactocina 705, reporta que esta bacteriocina producidas por bacterias lácticas podría prever de un control adicional a estos productos carnicos. Los experimentos controles se llevaron a cabo utilizando una variante negativa en la producción de bacteriocinas (bac-) obtenida por mutagenesis con nitroguanidina. *Lactobacillus casei* CRL 750 bac+ y bac-, eran resistentes a espectinomina mientras que *Listeria monocytogenes* fue sensible a este antibiótico y resistente a la polimixina.

**Sánchez, et al. 1996.** Realizaron estudios con bacteriocinas producidas por 2 cepas de *Lactobacillus plantarum* como inhibidoras de bacterias patógenas en pescado, ambas cepas desarrollaron actividades de inhibición al ser enfrentadas con cepas de *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*

*sp.*, aisladas de pescado fresco. Las bacteriocinas producidas por las cepas de *Lactobacillus plantarum* se obtuvieron a partir de cultivos de 48 horas a 30°C en caldo MRS Rogosa al que se le añadió 1% de NaCl. Los cultivos fueron centrifugados a 7000rpm por 15 minutos y filtrados a través de membranas manteniéndolas luego de la filtración a 4°C.

**Tejada, D. 1996**, realizó estudios experimentales en salchichas de carne de pollo elaboradas con suplantación de un cultivo protector durante el proceso de curado y constituido por bacterias lácticas mixtas: *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, con el objetivo de inhibir el crecimiento de coliformes fecales. Determinando el número bacteriano para coliformes por el método de tubos múltiples (NMP) durante el proceso de curado en 24 horas y en 30 días de conservación a temperatura de refrigeración, siguiendo un diseño estadístico al azar a través de 6 repeticiones con sus respectivos controles.

**Schaafsma, G. 1996**. La leche fermentada en general, y más concretamente el yogur, tiene la propiedad de contener microorganismos vivos que les confieren cualidades organolépticas y nutricionales. Estos productos se consideran probióticos, ya que al ingerirse en ciertas cantidades ejercen efectos beneficiosos para la salud. Las bacterias consideradas como probióticos son entre otras *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*.

**Rodgers, S. 2001**. En su trabajo menciona que de acuerdo con el tipo de alimento que se pretende preservar con bacteriocinas,

para su almacenamiento, y lograr que todos los efectos en conjunto permitan la aplicación efectiva de estos biopreservantes, se podría requerir de la combinación con otros métodos de conservación como la refrigeración, un método utilizado para extender la vida útil de alimentos perecederos con lácteos y carnes, siendo *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas* ejemplos importantes de microorganismos que causan deterioro en refrigeración y que deben controlarse.

Otro aspecto importante en la acción de las bacteriocinas es la presencia de iones como  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Gd^{+2}$ , los cuales neutralizan la carga negativa de los fosfolípidos. Esto induce a una condensación fosfolipídica que incrementa la rigidez de la membrana citoplasmática evitando la acción antimicrobiana de la bacteriocina.

**Garneau, et al. 2002.** En su investigación demostraron que las bacteriocinas pueden tener un efecto antimicrobiano por si solas, aunque también existen los llamados “sistemas de péptidos” los cuales requieren de dos proteínas las cuales son inactivas de manera aislada, pero cuando se combinaban el efecto antimicrobiano se potenciaba. Además las bacteriocinas se agrupan en cuatro clases; ellos demostraron que la clase IV, agrupaba aquellas que se encuentran asociadas a lípidos o carbohidratos.

**Tobía, et al. 2003.** Realizaron un estudio en plantas enteras de soya (*Glycine max* L. Merr.) (Semillas completamente llenas) y seccionadas en trozos de aproximadamente 2 cm. fueron ensiladas en microsilos de 1 Kg., con y sin deshidratación parcial (DP); a los silos se les añadió 0, 4 y 8% de melaza de caña

azúcar. Los aislamientos bacterianos lo realizaron en los microsilos con 4 y 8% de melaza y sin DP, debido a que éstos presentaron las mejores características sensoriales, los menores valores de pH y la menor diversidad de morfotipos bacterianos. Los cultivos lo hicieron en agar Rogosa y a las colonias seleccionadas le efectuaron las pruebas de Gram y catalasa; las que correspondieron a bacilos Gram positivos y catalasa negativos, fueron inoculadas en galerías Api 50 CHL®, para su identificación como bacterias ácido lácticas (BAL). Las cepas aisladas correspondieron a *Lactobacillus brevis*.

**Ruth, et al. 2003.** En su estudio se evaluó la calidad bacteriológica de quesos frescos artesanales y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus spp.* Tomaron 39 muestras de 100g cada una de queso fresco artesanal (de leche de vaca) adquiridas en los 7 mercados municipales del distrito Pueblo Libre, Lima, Perú, entre septiembre y diciembre de 2001. Se registraron el pH de la muestra y sus características organolépticas (olor y color), así como la temperatura y la humedad ambiental el día del muestreo. Mediante técnicas microbiológicas convencionales de cultivo se evaluó la carga microbiana de bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y fecales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus spp.* y analizaron la correlación entre la presencia de esta última bacteria y la de las anteriores.

**Bromberg, et al. 2006.** En su investigación aislaron bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas en carne y productos cárnicos, como resultado obtuvieron la detección de una bacteria ácido láctica productora de bacteriocinas *Lactococcus lactis ssp. hordniae* CTC 484, aislada de carne de

pollo. La bacteriocina inhibió no sólo a bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus helveticus*), sino también a los microorganismos patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y *Enterococcus faecalis*). Este compuesto fue inactivado por enzimas como la  $\alpha$ -quimotripsina, la tripsina, pronasa E, ficina, la pepsina, la papaína y la lipasa. Además, la bacteriocina se mostró estable al calor, incluso a temperaturas de autoclave (121 ° C/10 min) y fue producida bajo condiciones de almacenamiento refrigerado. La bacteriocina demostró ser activa en una amplia gama de valores de pH (2 – 10), aunque su mayor actividad fue en valores de pH más bajos.

**Suárez, 2008.** En su estudio sobre que la fermentación de los alimentos por bacterias ácido lácticas es una de las formas más antiguas de conservación usadas por el hombre. Quizás lo más significativo en estas fermentaciones es la conservación de los alimentos perecederos resultantes de la producción de ácido láctico y otros metabolitos tales como: ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, diacetilo y bacteriocinas.

**Rojas, et al. 2008.** Realizaron un estudio de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas LAB, debido a su amplia aplicación en productos lácteos y fermentados y que su aplicación podría ser, de manera general, en la industria alimentaria. Las bacteriocinas han atraído la atención como sustituto potencial de compuestos preservantes porque son producidas por bacterias consideradas benéficas para la salud y en la producción de alimentos. Estos compuestos purificados o semipurificados pueden ser utilizados como biopreservantes en alimentos para la reducción o eliminación de ciertos

microorganismos de deterioro y algunos patógenos como *Listeria monocytogenes*

**Viloche, et al. 2009.** En su investigación aislaron *Lactobacillus* usando como medio selectivo, el medio de cultivo agar rogosa, adecuado para el aislamiento de lactobacilos a partir de productos fermentados como yogurt, queso y leche. Los lactobacilos son muy exigentes a los requerimientos nutritivos, creciendo en forma anaerobia y microaerófila, en una atmósfera con CO<sub>2</sub>.

**Durán, et al. 2010.** Realizaron una investigación para evaluar la calidad higiénica del queso de capa del municipio de Mompóx en el departamento de Bolívar, Colombia y la capacidad bactericida de *Lactobacillus* spp aislados de un producto comercial (yogurt). Se tomaron 16 muestras de 200 g en cuatro sitios de fabricación del queso de capa, entre abril y noviembre del 2006; fueron empacadas en bolsas estériles y trasladadas en nevera de icopor con hielo hasta el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de Cartagena, allí se evaluó la carga microbiana de mesófilos aerobios, coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli* y *Salmonella*. Este estudio arrojó un promedio de mesófilos aerobios  $1,5 \times 10^8$ , de coliformes totales  $2,5 \times 10^3$ ; se confirmó la presencia de *E. coli* y la ausencia de *Salmonella*, así como de cepas ácido lácticas en las muestras estudiadas

## III. MATERIALES Y METODOS

### 3.1 Materiales:

#### Material biológico:

Quesos frescos comercializados en la Provincia de Huarochirí Departamento de Lima

Cepas bacterianas controles:

- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Pseudomona aeruginosa*

#### Medios de cultivos

##### 1. Caldos:

- Caldo nutritivo
- Caldo MRS rogosa
- Peptona

##### 2. Agares

- Agar MRS rogosa
- Agar nutritivo
- Agar Mueller Hinton

- **Otros materiales de vidrio, reactivos y equipos usados en habitualmente en un laboratorio de microbiología.**

## **3.2 Metodología:**

### **3.2.1 Recolección de las muestras.**

Se analizaron un total de 50 muestras de quesos frescos (20 kg) los cuales fueron comprados en los mercados, centros de acopio y/o distribución de productos lácteos de la Provincia de Huarochirí: Distrito de Huarochirí, San Mateo de Otao (Zona de Pomacocha y Hullaqui), Matucana (Zona Unturos), Santa Eulalia (Zona Huanza) y Carampoma, embolsadas y refrigeradas a 4°C hasta su llegada al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Ricardo Palma donde se procesaron.

### **3.2.2 Aislamiento y preselección de las bacterias lácticas (BAL) de queso elaborado artesanalmente.**

#### **Procedimiento:**

Para el aislamiento se tomó una muestra de 20 gramos de la porción central del queso fresco en 50 mL de agua peptonada donde se procedió a su homogenización y se incubó a 37°C durante aproximadamente 8 horas para revitalizar la flora bacteriana presente en las muestras de estudio. Luego se tomó 0.5 mL del homogenizado y incorporo por la técnica de diseminación con espátula de Drigalsky, sobre la superficie de agar Rogosa (MRS) y se llevó a incubar las placas a una temperatura de 37°C durante 72 horas. Finalizada la incubación se seleccionó las colonias que presentaban las

siguientes características morfológicas: tamaño pequeño (1 – 5 mm de diámetro), forma convexa, bordes lisos, de color blanco o cremas y sin pigmento.

### **3.2.3 Bacterias Lácticas (BAL) preseleccionadas en Agar MRS.**

Para la preparación del cepario se tomó una colonia seleccionada con las características establecidas: tamaño pequeño (1 – 5 mm de diámetro), forma convexa, bordes lisos, de color blanco o cremas y sin pigmento.

Las bacterias lácticas seleccionadas se guardaron en congelación a -20°C y refrigeración a 4°C, a las cuales se le agrego 1mL glicerina como un crioprotector.

### **3.2.4 Obtención de la bacteriocina de las Bacterias Lácticas (BAL)**

- Obtención de sobrenadantes libres de célula:

Las cepas seleccionadas de las bacterias lácticas incubadas a 37 ° C por 24 horas en anaerobiosis, se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C con un pH ajustado de 6.2 con NaOH 1M.

### 3.2.5 Estudio de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas por el Método de Difusión en Agar en Pocillos.

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas se determinó utilizando el sobrenadante de las células libres, las cuales fueron enfrentadas a bacterias referenciales donde se observó la inhibición medida en milímetros.

#### Procedimiento:

##### 1. Preparación de Pocillos de Difusión en Agar Mueller Hinton:

Se procedió a realizar los pocillos en el agar Mueller Hinton con un diámetro de 6 mm y con una profundidad de 0.5 cm; fueron expuestos a radiación UV durante 15 minutos para su esterilización.

✓ <i>Escherichia coli</i>
✓ <i>Staphylococcus aureus</i>
✓ <i>Streptococcus pyogenes</i>
✓ <i>Pseudomona aeruginosa</i>

Posteriormente se sembró los microorganismos patógenos indicadores (Tabla N° 1) por la técnica de disseminación con la ayuda de hisopos estériles sobre la superficie del Agar Mueller Hinton.

Tabla N° 1. Microorganismos patógenos indicadores

## **2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas:**

Obtenidos los sobrenadantes de las cepas seleccionadas de las bacterias lácticas, se procedió a colocar el sobrenadante de las bacterias lácticas en los pocillos de agar Mueller Hinton, con la ayuda de una micropipeta se colocó 0.5 mL del sobrenadante en cada pocillo, se dejó reposar durante 7 minutos a 6°C en refrigeración para que absorba el medio de cultivo la bacteriocina, luego se incubó a 37 °C por 24 horas para evaluar la formación del halo de inhibición.

### **3.2.6 Comparación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas con disco de antibiótico.**

Se realizó un estudio comparativo para determinar la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas, utilizando un patrón de comparación con un antibiótico de amplio espectro, eficaz frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. (Tabla N° 2)

Tabla N° 2. Antibiótico Patrón

<b>Bacterias:</b>	<b>Antibiótico</b>
Gram positivas Gram negativas	Ampicilina

### **3.2.7 Identificación Bioquímica de las Bacterias Lácticas (BAL) con el Método API 50CH– BIOMÉRIEUX**

La identificación de las especies de bacterias ácido lácticas se realizó mediante el Método API 50 CH – **BIOMÉRIEUX**

#### **Procedimiento:**

##### **I. Preparación del Inóculo**

- Las cepas de bacterias lácticas aisladas fueron cultivadas en caldo MRS a 37°C por 18 horas y con un pH 6.5 en anaerobiosis y se verificó la concentración de acuerdo al grado de turbidez en la escala de McFarland número 2.
- El cultivo bacteriano se transfirió equitativamente en 2 tubos de 13 x 100 mL con la ayuda de una pipeta estéril. Posteriormente se abrió la ampolla de API 50 CHL Medium y se transfirió con la ayuda de una pipeta estéril a ambos tubos que contenían el cultivo, hasta obtener una suspensión bacteriana homogénea. Dicha suspensión se utilizó de inmediato.

##### **II. Preparación de las galerías**

- Se preparó la galería API 50 CH con una cámara de incubación y se anotó el código de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara y se repartió unos 10 mL de agua destilada en los alvéolos del fondo para crear una atmósfera húmeda.

- Se sacó cada una de las filas de su embalaje, las cuales fueron separadas en dos las filas 0-19 y 20-39 y colocadas en el fondo de la cámara de incubación, así hasta completar la galería con la fila 40-49.

### **III. Inoculación de las galerías**

- Se repartió la suspensión bacteriana con la ayuda de una pipeta estéril en los 50 tubos de la galería (Tabla N° 3).
- Se inclinó ligeramente hacia delante la cámara de incubación para evitar la formación de burbujas apoyando la punta de la pipeta en el borde de la cúpula, y se inoculó el tubo, hasta no rebasar el límite superior del mismo con el fin de conservar una buena anaerobiosis, llenando el tubo y la cúpula completamente, evitando la formación de un menisco cóncavo o convexo.
- Se incubó las galerías a la temperatura óptima de crecimiento 37°C durante 24horas.

Tabla N° 3. Composición de la galería API 50 CH

Filas de 0 a 9			Filas de 10 a 19		
Tubo	Ensayo	Componentes activo	Tubo	Ensayo	Componentes activo
0		TESTIGO	10	GAL	D-GALactosa
1	GLY	GLIcerol	11	GLU	D-GLUcosa
2	ERY	ERItrol	12	FRU	D-FRUctosa
3	DARA	D-ARAbinosa	13	MNE	D-MamNosA
4	LARA	L-ARAbinosa	14	SBE	L-SorBosa
5	RIB	D-RIBosa	15	RHA	L-RHAMnosa
6	DXYL	D-XILosa	16	DUL	DULcitol
7	LXYL	L-XILosa	17	INO	INOsitol
8	ADO	D-ADOnitol	18	MAN	D-MANitol
9	MDX	Metil-βD-Xilopiranosida	19	SOR	D-SORbitol

Filas de 20 a 29			Filas de 30 a 39		
Tubo	Ensayo	Componentes activo	Tubo	Ensayo	Componentes activo
20	MDM	Metil-αD-Manopiranosida	30	MEL	D-MELibiosa
21	MDG	Metil-αD-Glucopiranosida	31	SAC	D-SACarosa
22	NAG	N-AcetilGlucosamina	32	TRE	D-TREhalosa
23	AMY	AMIdalina	33	INU	INUlina
24	ARB	ARButina	34	MLZ	D-MeLeZitosa
25	ESC	ESCulina citrato férrico	35	RAF	D-RAFInosa
26	SAL	SALicina	36	AMD	AlmiDón
27	CEL	D-CELOBiosa	37	GLYG	GLIcóGeno
28	MAL	D-MALTosa	38	XLT	XiLiToI
29	LAC	D-LACTosa (origen bovino)	39	GEN	GENtiobiosa

Filas de 40 a 49		
Tubo	Ensayo	Componentes activo
40	TUR	D-TURanosa
41	LYX	D-LIXosa
42	TAG	D-TAGatosa
43	DFUC	D-FUCosa
44	LFUC	L-FUCosa
45	DARL	D-ARAbitoL
46	LARL	L-ARAbitoL
47	GNT	GlucóNaTo potásico
48	2KG	2-CetoGlucónato potásico
49	5KG	5-CetoGlucónato potásico

## IV. RESULTADOS.

### 4.1 Actividad Antimicrobiana del sobrenadante de las cepas de bacterias lácticas (BAL)

- a. Se obtuvieron 100 cepas bacterianas las cuales, fueron codificadas previamente según la zona de recolección (Tabla N° 4):

Tabla N° 4.

Ítem	Código	Localización
1	PM y P	Pomacocha - San Mateo de Otao
2	UM y U	Unturos - Matucana
3	RM y R	Requesón de San Mateo de Otao
4	HM y H	Huanza, Santa Eulalia-Carampoma

- b. De las cepas de bacterias lácticas aisladas que presentaron actividad bactericida frente a los microorganismos patógenos indicadores *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* fueron las cepas P06 y UM18 con 24% de actividad; la cepa U16 con 15% de actividad frente a *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*; las cepas U14, HM38 y HM39 con un 10% frente a *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus*

- pyogenes*, y por último la cepa P05 que presentó menor actividad bactericida solo con 7% frente a *Escherichia coli*. (Gráfico N° 1).
- c. La cepa P06 aislada de la muestra de queso precedente de la localidad de San Mateo de Otao (Zona de Pomacocha) formó un halo de inhibición correspondiente a 20mm de diámetro frente a *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*, en comparación con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* donde se formó un halo de inhibición correspondiente a 18mm y 17mm de diámetro respectivamente. (Gráfico N° 2).
- d. Para el caso del control de antibiótico se formó un halo de inhibición correspondiente a 36mm de diámetro para *Staphylococcus aureus*, 26mm de diámetro para *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* respectivamente y 21mm de diámetro para *Streptococcus pyogenes*. (Gráfico N° 3).
- e. La cepa UM 18 aislada de la muestra de queso precedente de la de la localidad de Matucana (Zona Unturos) formó un halo de inhibición correspondiente a 21 mm de diámetro frente a *Pseudomona aeruginosa*, de 19mm de diámetro frente *Staphylococcus aureus*., de 18mm y 16mm de diámetro frente a *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* respectivamente. (Gráfico N° 4).
- f. La cepa U16 aislada de la muestra de queso precedente de la localidad de Matucana (Zona Unturos), formó un

halo de inhibición correspondiente a 15mm de diámetro frente a *Escherichia coli* y de 14mm de diámetro frente a *Staphylococcus aureus* en comparación con *Pseudomona aeruginosa* que formó un halo de inhibición correspondiente a 13mm de diámetro. Finalmente *Streptococcus pyogenes* donde no formó ningún halo de inhibición. (Gráfico N° 5).

g. La cepa U14 aislada de la muestra de queso precedente de la localidad de Matucana (Zona Unturos) formó un halo de inhibición correspondiente a 17mm de diámetro frente a *Pseudomona aeruginosa* y 16mm de diámetro frente a *Escherichia coli*, a diferencia de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* donde no se formó ningún halo de inhibición. (Gráfico N° 6).

h. La cepa HM 38 aislada de la muestra de queso precedente de la localidad de Santa Eulalia – Carampoma (Zona Huanza) formó un halo de inhibición correspondiente a 17mm de diámetro frente a *Streptococcus pyogenes* y 11mm de diámetro frente a *Staphylococcus aureus*, a diferencia de *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* donde no se formó ningún halo de inhibición. (Gráfico N° 7).

i. La cepa HM 39 aislada de la muestra de queso precedente de la localidad de Santa Eulalia – Carampoma (Zona Huanza) formó un halo de inhibición correspondiente a 15mm de diámetro frente a *Pseudomona aeruginosa* y 12mm de diámetro frente a *Staphylococcus aureus*, a diferencia de *Escherichia coli*

y *Streptococcus pyogenes* donde no se formó ningún halo de inhibición. (Gráfico N° 8).

- j. Finalmente la cepa P05 (Gráfico N° 9) aislada de la muestra de queso precedente de la localidad de San Mateo de Otao (Zona de Pomacocha) solo tuvo actividad bactericida frente a *Escherichia coli*, donde produjo un halo de inhibición correspondiente a 12mm de diámetro, a diferencia de *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* donde formó ningún halo de inhibición.

#### **4.2 Mediante el método rápido de identificación bioquímica api 50CH BIOMÉRIEUX se identificaron las siguientes bacterias lácticas (BAL)**

Las especies de bacterias lácticas identificadas son: (Tabla V):

Tabla V. Bacterias Lácticas

<b>Cepas</b>	<b>Bacterias Lácticas</b>
P06	<i>Lactobacillus curvatus ssp curvatus</i>
UM18	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
U16	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>
U14	<i>Lactococcus lactis ssp hordniae</i>
HM38	<i>Lactobacillus brevis</i>
HM39	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
P05	<i>Lactobacillus helveticus</i>

## V. DISCUSIÓN.

Se identificaron 7 especies de bacterias lácticas por el método rápido de identificación bioquímica API 50CH, las especies identificadas fueron: *Lactobacillus paracasei ssp paracasei*, *Lactococcus lactis ssp hordniae*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus ssp curvatus* y *Lactobacillus helveticus*. Las especies con mayor actividad antimicrobiana frente a los microorganismos patógenos indicadores como *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* fueron *Lactobacillus curvatus ssp curvatus* y *Lactobacillus rhamnosus* con 24% de actividad bactericida y *Lactobacillus helveticus* presento menor actividad bactericida en 7% frente a *Escherichia coli*.

Estos resultados obtenidos se pueden comparar con el trabajo de investigación realizado por Cristóbal, R. en el 2008 donde aisló bacterias ácido lácticas procedentes de quesos artesanales mediante la prueba de asimilación de carbohidratos usando como medio base el caldo para carbohidratos con indicador de Andrade, donde solamente el 16.42% presentaron actividad bactericida frente a *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 microorganismo indicador gram positivo, las especies de bacterias lácticas que presentaron actividad bactericida fueron *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus lactis*.

Por otro lado Anas, M., *et al.* 2008 en su investigación utilizaron métodos microbiológicos y bioquímicos para identificar bacterias lácticas que tienen actividad antimicrobiana. Obtuvo 8 cepas de bacterias lácticas a partir de leche de cruda cabra en las zonas del oeste de Argelia. Las especies dominantes que identificó pertenecen al género *Lactobacillus*, estas son: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus Delbrueckii ssp lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paraplantarum* y *Lactobacillus sakei ssp. Sakei*. Solo tres especies de *Lactobacillus*: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus* fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Sedano en el 2006 realizó una selección de cepas nativas de *Lactobacillus* a partir de 11 muestras de masato procedentes de Pucallpa – Ucayali las cuales fueron sembradas en agar MRS Rogosa con pH 6.5 e incubadas a 30° C por 72 horas en condiciones de microaerofilia. En este estudio, se aisló 81 bacterias lácticas, de los cuales sólo el 15% de la especie *Lactobacillus acidophilus* presentó actividad antimicrobiana y en menores porcentajes de *Lactobacillus brevis*. Sedano propuso a las cepas de *Lactobacillus acidophilus*, como una cepa de interés biotecnológico.

Martín del Campo M. *et al.* 2008, En su trabajo de investigación aislaron 350 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL), a partir de 35 muestras de quesos frescos, las cuales fueron probadas en contra de cuatro microorganismos patógenos, tres Gram positivos (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) y un Gram negativo (*Salmonella agona*). Sólo 25 cepas

mostraron capacidad antagónica, el mayor efecto inhibidor fue debido al pH, por la producción de ácidos orgánicos. 8 de ellas, mostraron un efecto inhibidor diferente al pH, Todas las cepas mostraron actividad antagónica en contra de las bacterias Gram positivas. Tres cepas mostraron inhibición con el sobrenadante, y se trataron con enzimas proteolíticas, y se determinó que el factor inhibidor es de origen proteico. De otro lado Zamudio, K. *et al.* 2003, Seleccionaron 9 cepas de *Lactobacillus* aislados de diferentes fuentes naturales. Las especies de *Lactobacillus* fueron identificadas por el perfil de fermentación de carbohidratos, los *Lactobacillus* seleccionados pertenecen a las especies: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus fermentum* correspondiendo en número de cepas por especie 3, 3, 2 y 1 respectivamente.

## VI. CONCLUSIONES.

- Se identificaron 7 especies de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas: *Lactobacillus paracasei ssp paracasei*, *Lactococcus lactis ssp hordniae*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus ssp curvatus* y *Lactobacillus helveticus*.
- Las cepas P06 y UM18 presentaron un 24% actividad bactericida frente a los microorganismos patógenos indicadores correspondiendo este porcentaje a las especies *Lactobacillus curvatus ssp curvatus* y *Lactobacillus rhamnosus* respectivamente.
- La cepa UM 18 correspondiente a la especie *Lactobacillus rhamnosus* presentó una amplia actividad bactericida frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.
- La cepa P06 correspondiente a la especie *Lactobacillus curvatus ssp curvatus* presentó una amplia actividad bactericida frente a *Pseudomona aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*.

## VII. RECOMENDACIONES.

- Incorporar a los procesos de elaboración artesanal de queso fresco, cepas bacterianas con poder bactericida, como un control natural en la calidad e inocuidad del queso fresco.
- Estandarizar un starter (Mix de bacterias) de bacterias lácticas aisladas, que permitan obtener un tipo de queso fresco con características propias respecto a la textura, el sabor y el olor. Para ser aplicado a nivel de todo el territorio peruano como una denominación de marca, para la localidad productora de quesos o de todo el país.
- Poder generar un registro nacional de cepas de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas de las diferentes localidades del Perú productoras de queso fresco con la finalidad de obtener otras variedades de quesos con características de calidad e inocuidad.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Altena, K.; Guder, A.; Cramer, C.; Bierbaum, G. 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.*
2. Anas, M.; Jamal, H. & Mebrouk, K. 2008. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*. Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Oran University. Oran, Algeria. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 3 (2): 39-49pp.
3. Arqués, J. 2003. Tratamientos combinados de bacteriocinas y otros Sistemas inhibitorios para la mejora de la Seguridad de los productos lácteos. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria- Departamento de Nutrición y Bromatología III. Tesis Doctoral, Madrid, España. 1-155pp
4. Axelsson, L. 2006. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Third Edition.. *Food Science and Technology*. Editorial Board. 1, 1-66pp.
5. Barefoot, S. & Nettles, G. 1993. Antibiosis Revisited: Bacteriocins Produce by Dairy Starter Cultures. *J Dairy Sci* 76.
6. Beukes, M.; Bierbaum, G.; Sahl, H.G & Hastings, J.W. 2000. Purification and partial characterization of a murein hydrolase,

Millericin B, produced by *Streptococcus milleri* NMSCC061- Appl Environ Microbiol. Jan 66 (1):23-8.

7. Bromberg, R.; Moreno, I.; Delboni, R.; Cintra, H. 2006. Characterisation of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *Hordniae* CTC 484 and the effect of this compound on *Listeria monocytogenes* in beef. Ciencia e Tecnologia de Alimentos, v. 26 n. 1 p. 135-144pp.
8. Bruno, M. & Montville, T. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria - Appl.Environ.Microbiol.
9. Campos, J. 2002. Cultivos Probióticos y Protectores, Propiedades Funcionales (Nutraceuticas) de Valor Agregado en los Derivados Lácteos. Lácteos y Cárnicos Mexicanos. Jun/Jul 26-37.
10. Carrasco, M.; Scarincini, H. & Simonetta, A. 2002. Antibacterial Activity of Lactic Acid bacteria Isolated from Argentinian Dairy Products. The Australian Journal of Dairy Technology. Vol. 57. No. 1, 15-19pp.
11. Casaus, M. 1998. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. Caracterización bioquímica y genética de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 y de la enterocina B de *Enterococcus faecium* T136. Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral. Madrid, España.

12. Cintas, L.; Casaus, P.; Hernández, P. 2000. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas y bacteriocinas. *Alimentación equipos y tecnología*. 19 (7): 109 – 119.
13. Cintas, L.; Casaus, M.; Herranz, C.; Nes, I. & Hernández, P. 2001 Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*. 7: 281 – 305pp
14. Cleveland, J. Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71: 1-20
15. Cristóbal, R. 2008. Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias. Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Facultad de Farmacia y Bioquímica. Tesis para obtener el Grado de Magíster en Microbiología. Lima, Perú. 44(3-11) pp.
16. Dellaglio, F.; de Roissart, H.; Torriani, S.; Curk, M.C. & Janssens, D. 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. En *Bactéries Lactiques*. H. de Roissart y F.M. Luquet (Ed.). Vol. I. 25-116pp. Loriga. Uriage, La France.
17. Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative – *Food Tech*. 44: 100-117.
18. Durán, M.; Montero, P.; Flórez, W.; Franco de la Hoz, V. & Coneo R. 2010. Evaluación Higiénico-Sanitaria y Acción Antagónica de Cepas de lactobacilos comerciales frente a Microorganismos patógenos (*Escherichia coli*) presentes en el queso de capa del municipio de mompox. Grupo de Investigación Nutrición, Salud y Calidad Alimentaria (NUSCA),

Programa Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad de Cartagena. Cartagena-Colombia. Revista científica, FCV-LUZ, 10(3). 312-317pp.

19. Eck, A. 1990. El Queso. Ed. Omega, Barcelona, España.
20. Foo, E.; Griffin, H.; Mollby, R. & Hedén, C. 1993. The Lactic Acid Bacteria. Horizon Scientific Press. United Kingdom, 89 – 91.
21. Fox, P.F.; Guinee, T.P.; Cogan, T.M. y Mcsweeney, P.L.H. 2000. Fundamentals of cheese science, An Aspen Publication, USA.
22. Garneau, S.; Martín N.I. y Vederas J.C. 2002. Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84: 577-592
23. González, B.; Glaasker, E.; Kunji, E.R.S.; Driessen, A.J.M.; Suárez, J.E. y Konings, W.N. 1996. Bactericidal mode of action of plantaricin C. *Appl. Environ. Microbiol.*
24. Gross, E. y Morell, J. 1971. The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.*
25. Hassan, A.N. y Frank, J.F. 2001. Starter cultures and their use. En H.E. Marth y L. Steele; Applied dairy microbiology. Second edition. Revised and expanded. Ed. Marcel Dekker, INC, New York, EEUU.
26. Hernández, A. 2009. Evaluación del Potencial probiótico de Cepas de *Lactobacillus* para su uso en un Alimento Funcional. Instituto Politécnico Nacional-Centro de Investigación en

Biotecnología Aplicada "CIBA-IPN Tlaxcala". Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala-México, Junio 2009. 112pp.

27. Hirsch, A. 1951. Growth and nisin production of strain of *Streptococcus lactis*. J. Gen. Microbiol. 5: 208-221.
28. Hoover, D.G. and Stenson, L.R. 1993. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Academic Press Inc. USA.
29. ICMSF (International comisión on microbiological specifications for food, of the international Union of Microbiological Societes). 2000. Microorganismos de los alimentos. Editorial University of Toronto Press.
30. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1985. Ecología microbiana de los alimentos: Productos alimenticios. Editorial Acribia Vol 2. Zaragoza, España
31. Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 39-86pp.
32. Konisky, J. 1982. Colicins and other bacteriocins with established mode of action – Annu. Rev. Microbiol. Review. 36: 125-144.
33. Kozak, W.; Bardowski, J. & Dobrzanski, W.T. 1978. Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by lactic streptococci. J. Dairy Res. 45: 247-257.

34. Luders, T., Birkemo, G.A., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. and Nes, I.F. 2003. Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1797-1799.
35. Martín del Campo M.; Héctor E. Gómez H.; Ricardo Alaníz de la O. 2008 Bacterias ácido lácticas con Capacidad antagónica y actividad Bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. *Rev. e-Gnosis*, Vol. 6, 2008, 1-17 pp.
36. Martínez, B. 1996. Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos: Nisina z y Lactococina 972. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC) y Área de Microbiología (Departamento de Biología Funcional) de la Universidad de Oviedo. Oviedo, España. 120pp.
37. Moll, G.N.; Konings, W.N.; Driessen, A.J. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Anton. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M.* 76: 185-198.
38. Monteville, T. J.Winkowski, K. y Ludescher, R.D. 1995. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *Int. Dairy J.*, 5: 797-814.
39. Müller, D. 2006. Péptidos bioactivos producidos por bacterias lácticas con actividad inhibitoria del desarrollo de microorganismos. Universidad Nacional del Litoral-Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Tesis Doctoral. Santa Fe, Argentina. 154pp.

40. Nes, I. & Jhonsborg, O. 2004. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 100-104.
41. Nissen-Meyer, J.; Holo, H.; Havarstein, L.S.; Sletten, K.; Nes, I.F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.*
42. Ogunbanwo S.T.; Nyberg, G.; Wrethen A.I.; Sanni, A.; Onilude, A. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1 200. *Afr. J. Biotechnol* 2 (7), 179-184pp.
43. Ouwehand, C.; Vesterlund, S. 2004. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*. Third Edition. Salminen S; Wright A. Ouwehand A. New York. *Food Science and Technology* 11, 375-395.
44. Ratto, M. 1983. Control microbiológico de leches y productos lácteos: Métodos recomendados. Cleiba – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Peru.
45. Riley, M.A.; Wertz, J.E. 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives - *Biochimie.* 84 (5-6): 357-364.
46. Rodgers, S. 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbia cultures – a review. *Trends in Food Science & Technology.* 12: 276-284

47. Rogers, L.A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bacteriol. 16: 321-325.
48. Rojas, C. & Vargas, Pedro. 2007. *Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria* Tecnología en Marcha, Vol. 21-2, 9-16pp.
49. Rojas, C.; Vargas, P. 2008. Sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en marcha* 12(2), 9-16pp.
50. Ruth, L.; Delgado, C. & Maurtua, D. 2003. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 14(3), 158 – 164pp.
51. Ruiz-Larrea, F.; Bezarez, R.; Sáenz, Y.; Navarro, L.; Díez, L.; Zarazaga, M. & Torres, C. 2006. Bacteriocinas para la Estabilización Microbiológica y Reducción de la dosis de SO<sub>2</sub>. *Departamento De Agricultura y Alimentación. Facultad De Ciencias, Universidad de La Rioja. España*, 1-13pp.
52. Schaafsma, G. 1996. State of the art concerning probiotic strains in milk products. IDF Nutr. Newsl. 5: 23-24. Madigan, M. Martinko J. (1988). Brock biología de los alimentos. Prentice hall Iberia. Madrid.
53. Sahl, H.G. 1991. Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics. En *Nisin and novel lantibiotics*. Jung, G. y

Sahl, H.G. (Ed.). ESCOM Science Publishers B.V. Leiden, The Netherlands. 347-358pp.

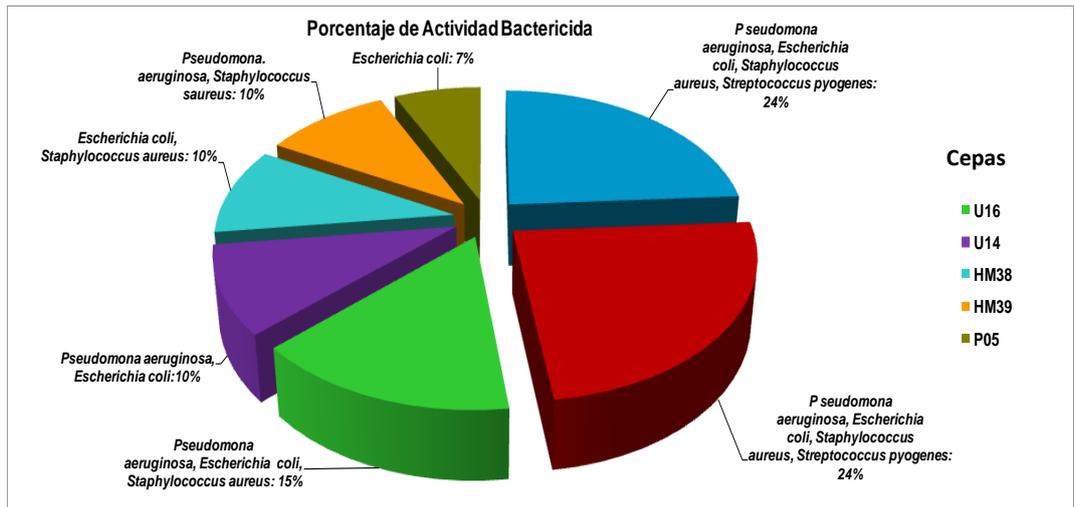
54. Sahl, H.G.; Bierbaum, G. 1998. Lanthibiotics: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 41-79.
55. Samaniego, L. & Sosa del Castillo, M. 2000. *Lactobacillus spp.*: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos" Matanzas-Cuba. La Habana: editorial Universitaria. 2000. 1-26pp.
56. Sánchez, J.; Neyra, E.; Ayala, M. 1996. Uso de Bacteriocinas como inhibidoras de bacterias patógenas en pescado. Instituto tecnológico Pesquero del Perú. IV Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. Libro de resúmenes. LAS/ Perú, ICMSF. Abril, 1996. Lima-Perú
57. Sedano J. 2006. Selección de cepas nativas de *Lactobacillus* con actividad inhibitoria y tolerantes al etanol aisladas de masato (Tesis Licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Facultad de Ciencias Biológicas. Lima, Perú. 68pp.
58. Stanley, G. 1998. Microbiología de los productos lácteos fermentados. En: R. Early; Tecnología de los productos lácteos. Segunda edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

59. Suárez, J.; 2008. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los Municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá). Universidad de la Salle Facultad de Zootecnia Bogotá D.C. 81 pp.
60. Tagg, J.R.; Dajani, A.S & Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria - *Bacteriol.Rev.* 40 (3): 722-756pp.
61. Tagg, J.R. 1991. Bacterial BLIS. *ASM News.* 57:611.
62. Tejada, D. 1996. Inhibición de coliformes fecales mediante cultivos protectores en salchichas de pollo. Universidad Ricardo Palma. Lima-Perú. IV Congreso latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. Libro de resúmenes. LAS/Perú. ICMSF. Abril. 1996. Lima-Perú.
63. Tobía, C.; Uribe, L.; Villalobos, E.; Soto, H.; Ferris, I. 2003. Aislamiento, selección y caracterización de bacterias ácido lácticas en ensilajes de soya. *Agronomía Costarricense* 27: 21-27pp.
64. Upreti, G.C. & Hinsdill, R.D. 1973. "Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*". *Antimicrob. Agents Chemother.* 4: 487-494.
65. Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; De Vos, P.; Kersters, K.; Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev* 60, 407-438.

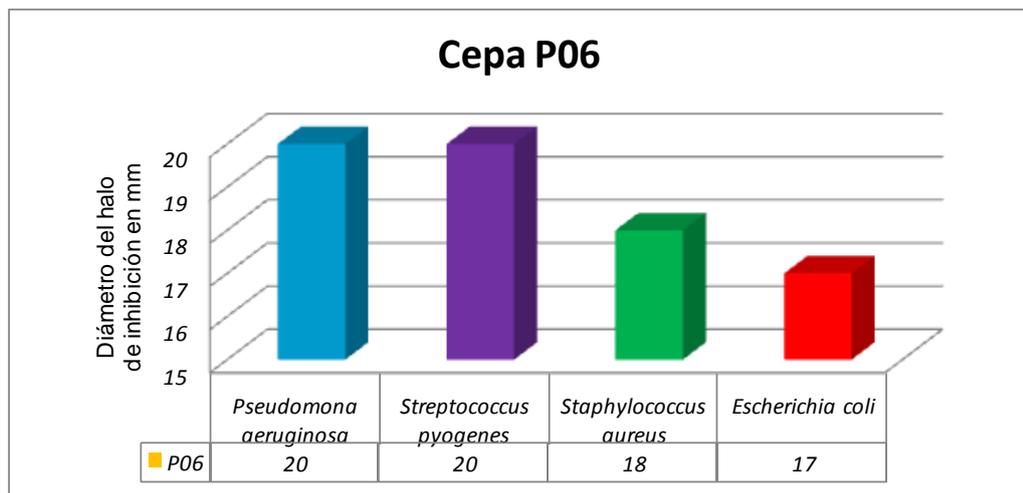
66. Vanderbergh, P.A. 1993. BAL Their Metabolic Products and Interference with Microbial Growth. FEMS. Microbiol. Rev. 12: 221-237.
67. Venema, K.; Abee, T.; Haandrikman, A.J.; Leenhouts, K.J.; Kok, J.; Konings, W.N.; Venema, G. 1993. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol.
68. Vignolo, G.; De Kairuz, M. 1996. Inhibición de *Listeria monocytogenes* en carne mediante la producción en situ de lactocina 705. Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA) Tucuman-Argentina. IV Congreso latinoamericano de microbiología e higiene de los Alimentos. Libro de resúmenes. LAS/ Perú. ICMSF. Abril. 1996. Lima-Perú.
69. Viloche, J. 2007. Aislamiento de *Lactobacillus* nativos de Productos de Fermentación en la ciudad de Tacna.
70. Yang, R. & Ray, B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiol. 11: 281-291.
71. Yang, Z. 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Disertación Académica de Tesis Doctoral. Department of Food Technology - University of Helsinki.
72. Zamudio, K. & Zavaleta, A. 2003. Estudio del Potencial Probiótico de Lactobacilos aislados de Fuentes Naturales. Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos -

Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú. Ciencia e Investigación. 6(1): 30 – 35pp.

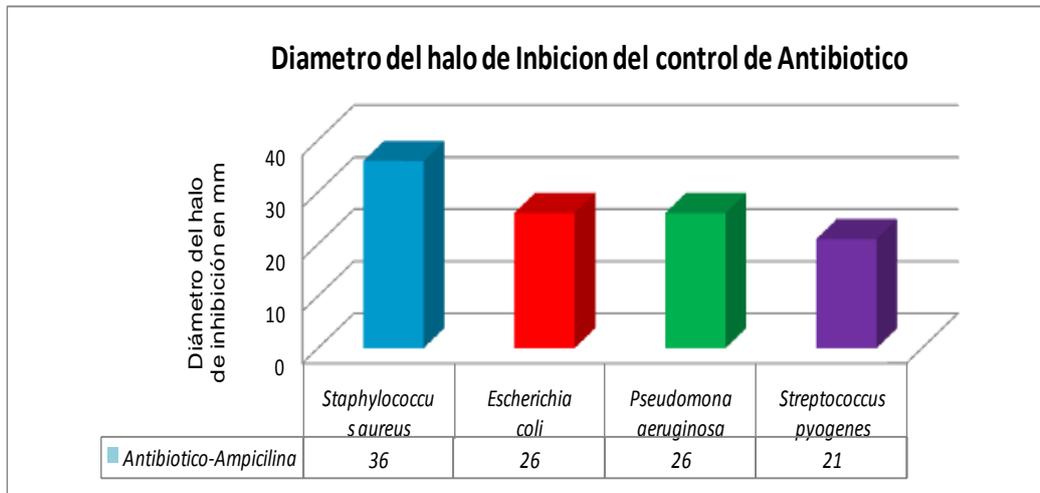
## IX. ANEXOS.



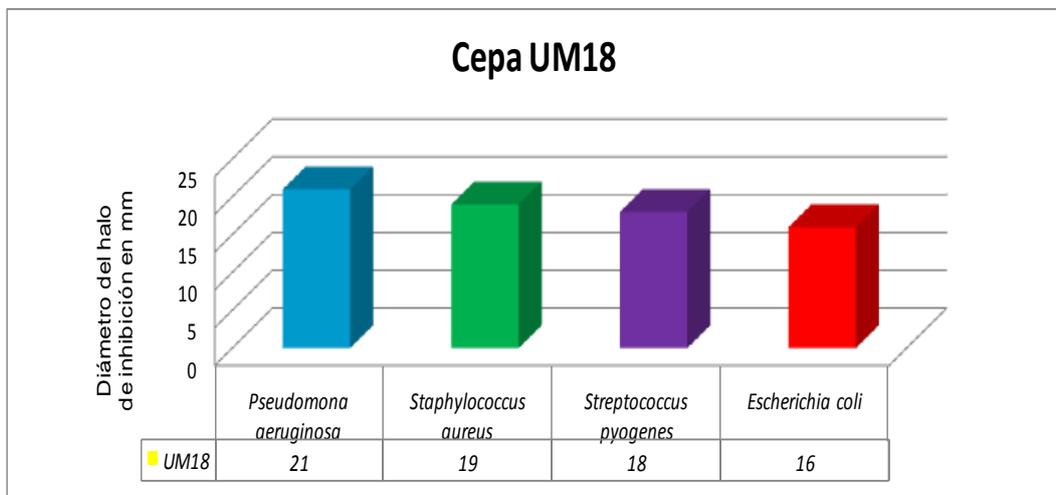
**Gráfico N° 1:** Porcentaje de actividad bactericida de las cepas de bacterias lácticas aisladas frente a las bacterias patógenas indicadoras.



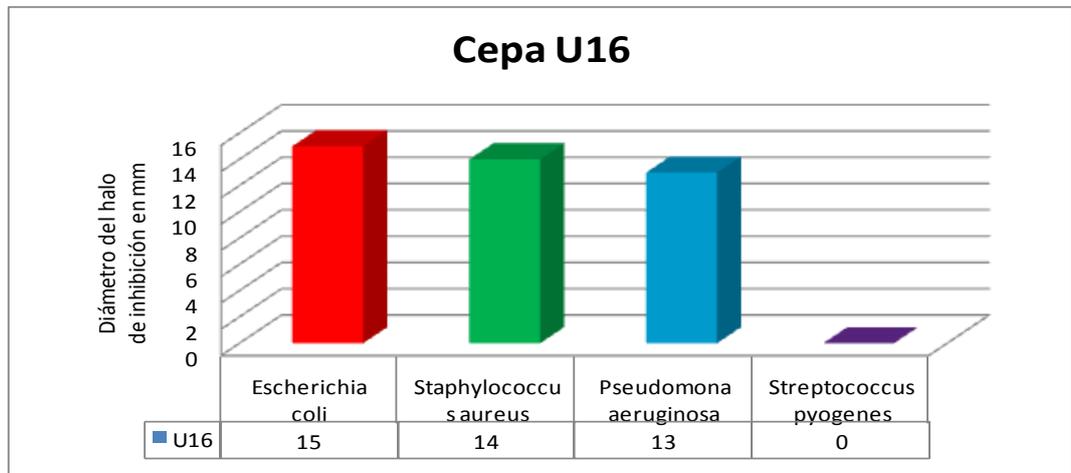
**Gráfico N° 2:** Diámetro del halo de inhibición formado por la cepa P06 frente a las bacterias patógenas indicadoras.



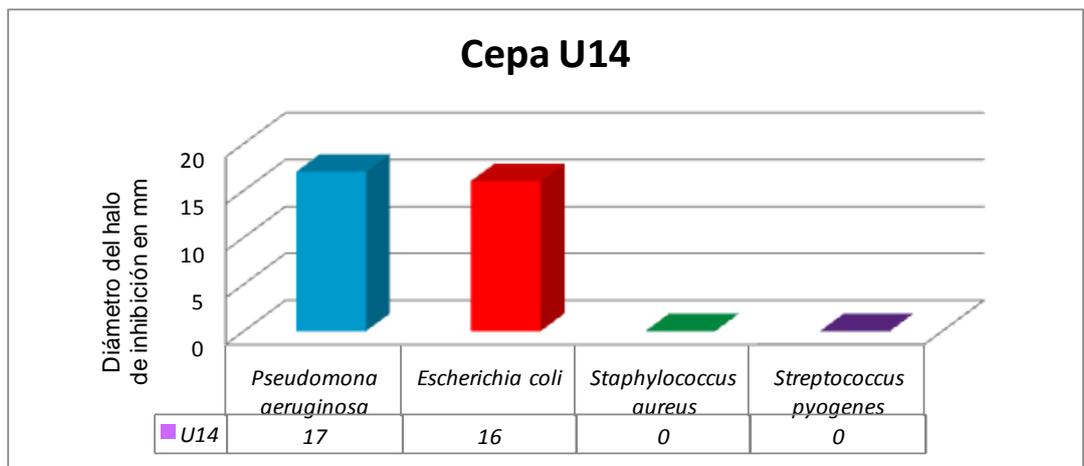
**Gráfico N° 3:** Diámetro del halo de inhibición formado por el control de antibiótico frente a las bacterias patógenas indicadoras.



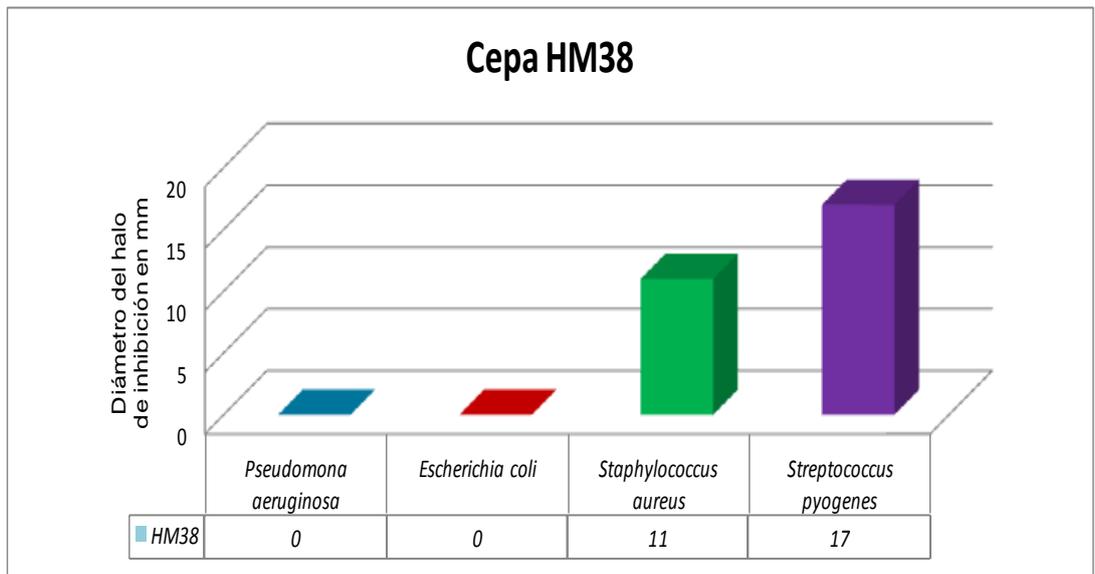
**Gráfico N° 4:** Diámetro del halo de inhibición formado por la cepa UM18 frente a las bacterias patógenas indicadoras.



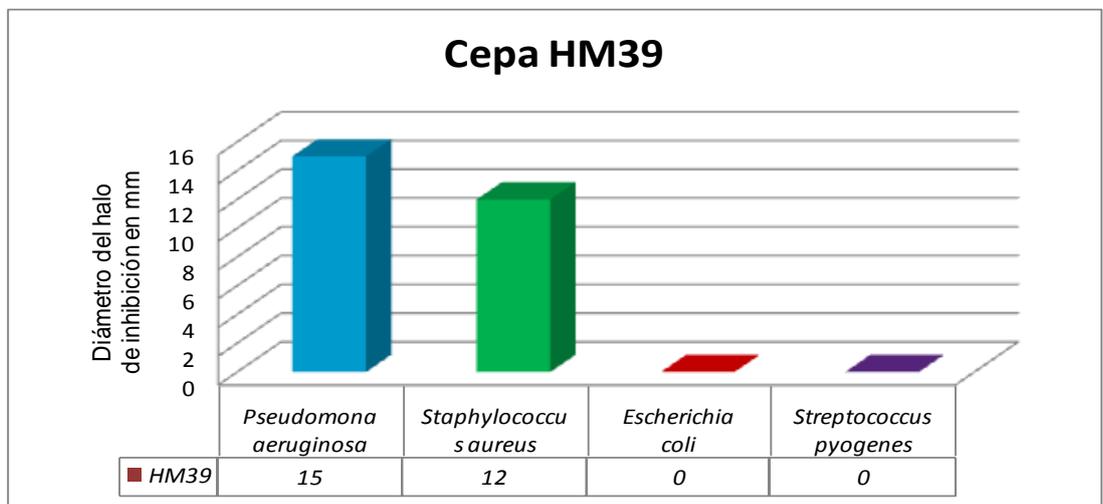
**Gráfico N° 5:** Diámetro del halo de inhibición formado por la cepa U16 frente a las bacterias patógenas indicadoras.



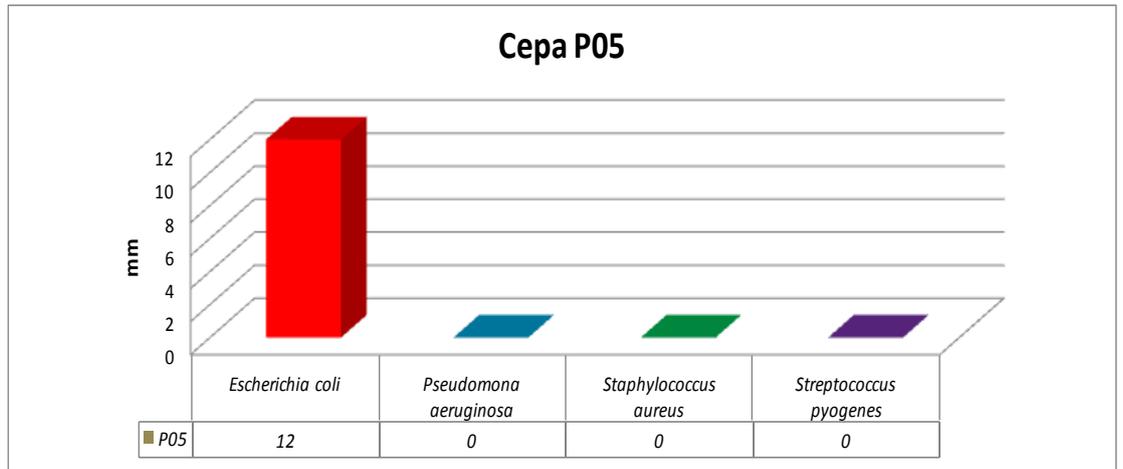
**Gráfico N° 6:** Diámetro del halo de inhibición formado por la cepa U14 frente a las bacterias patógenas indicadoras.



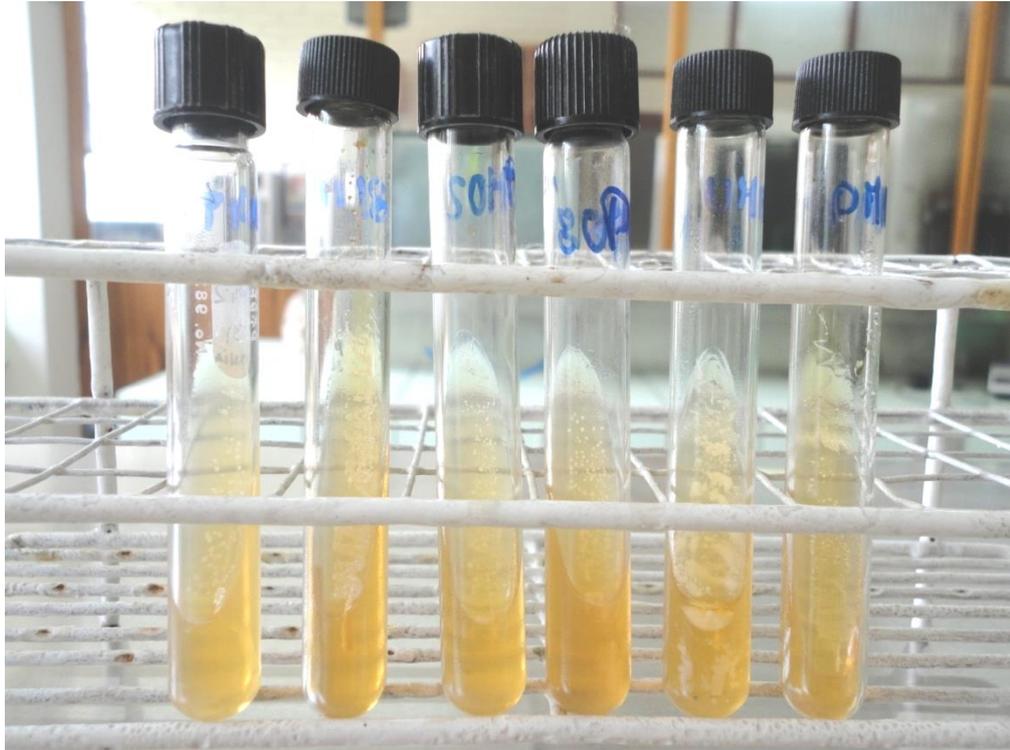
**Gráfico N° 7:** Diámetro del halo de inhibición formado por la cepa HM38 frente a las bacterias patógenas indicadoras.



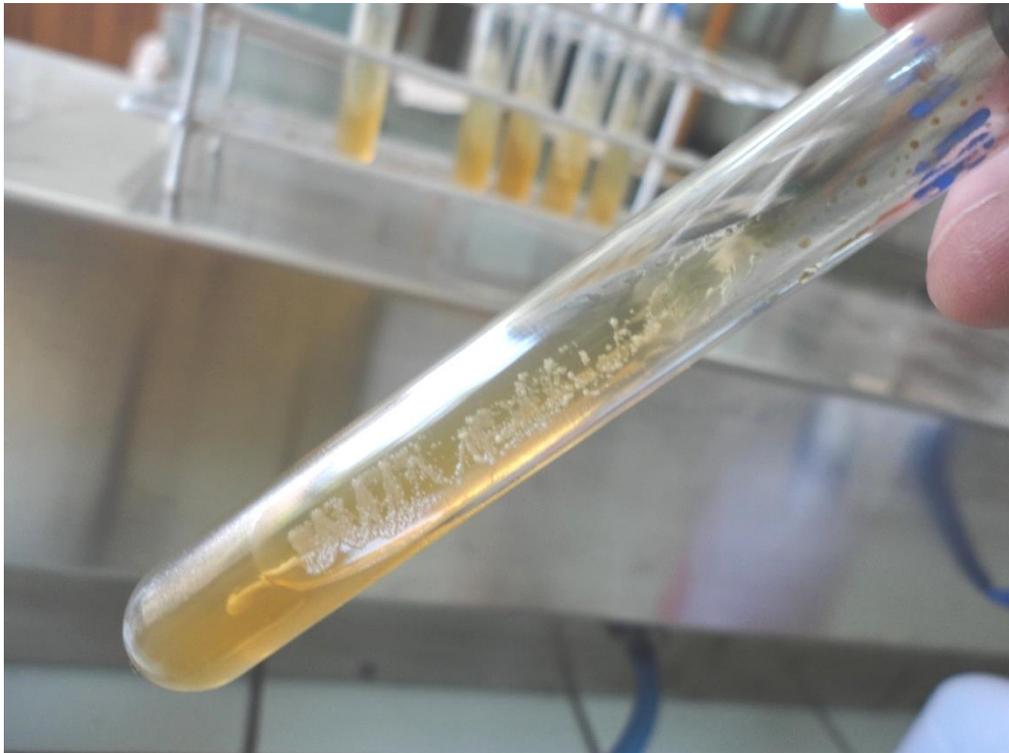
**Gráfico N° 8:** Diámetro del halo de inhibición formado por la cepa HM39 frente a las bacterias patógenas indicadoras.



**Gráfico N° 9:** Diámetro del halo de inhibición formado por la cepa HM39 frente a las bacterias patógenas indicadoras.



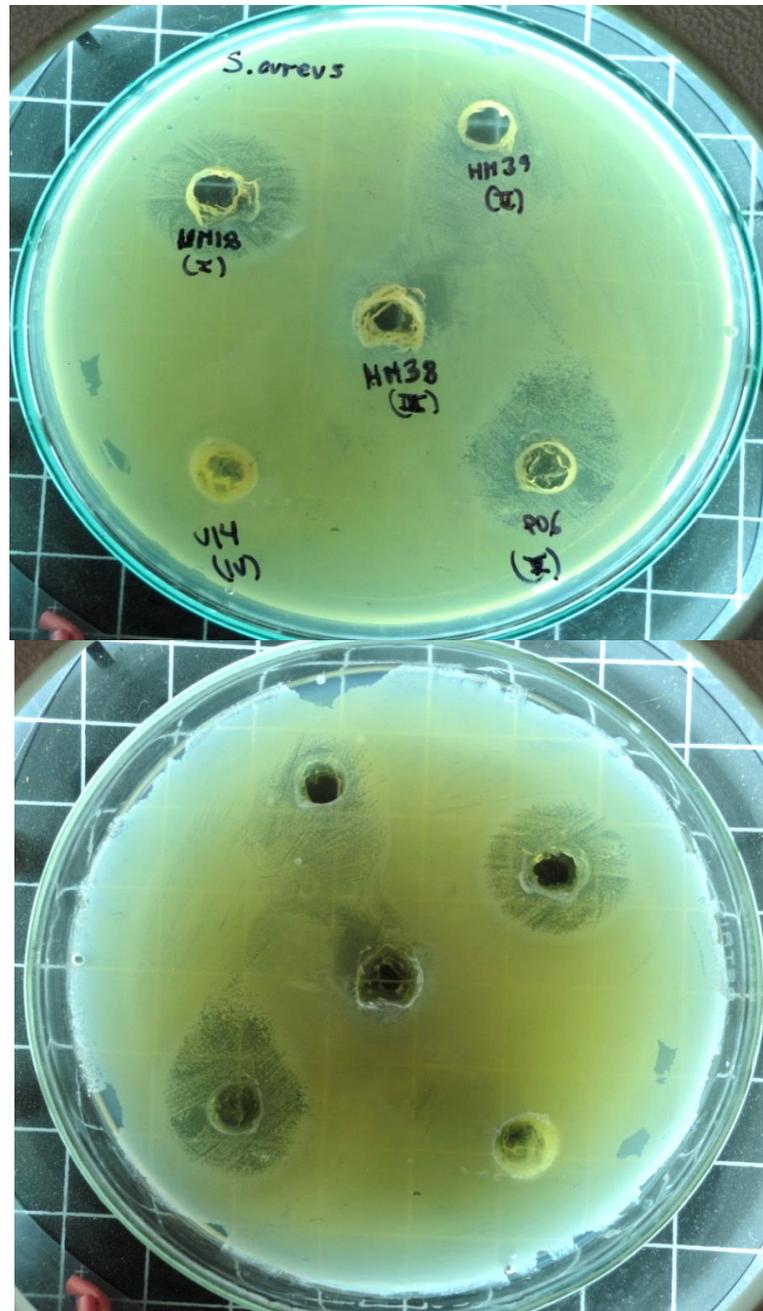
**Fig. N° 1:** Cepas de bacterias ácido lácticas bacterias lácticas aisladas en Agar MRS



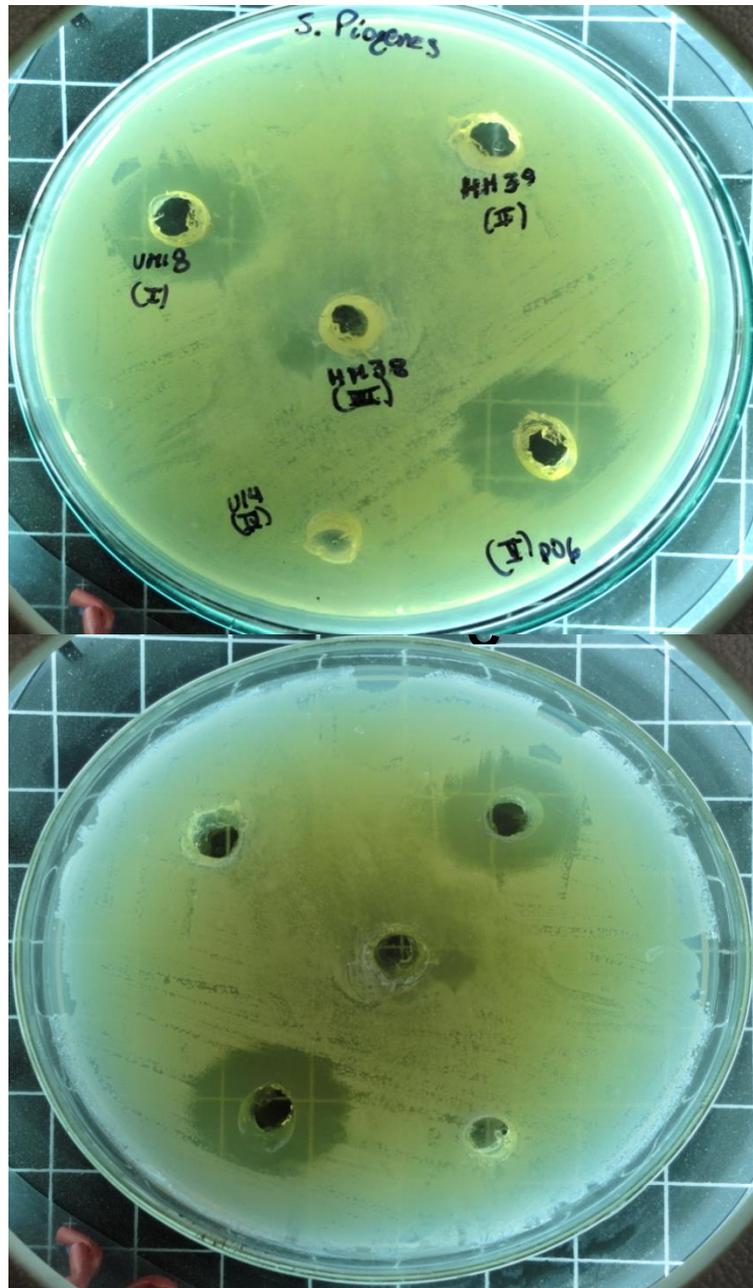
**Fig. N° 2:** Cepa HM38 de bacteria acido láctica aislada en agar MRS



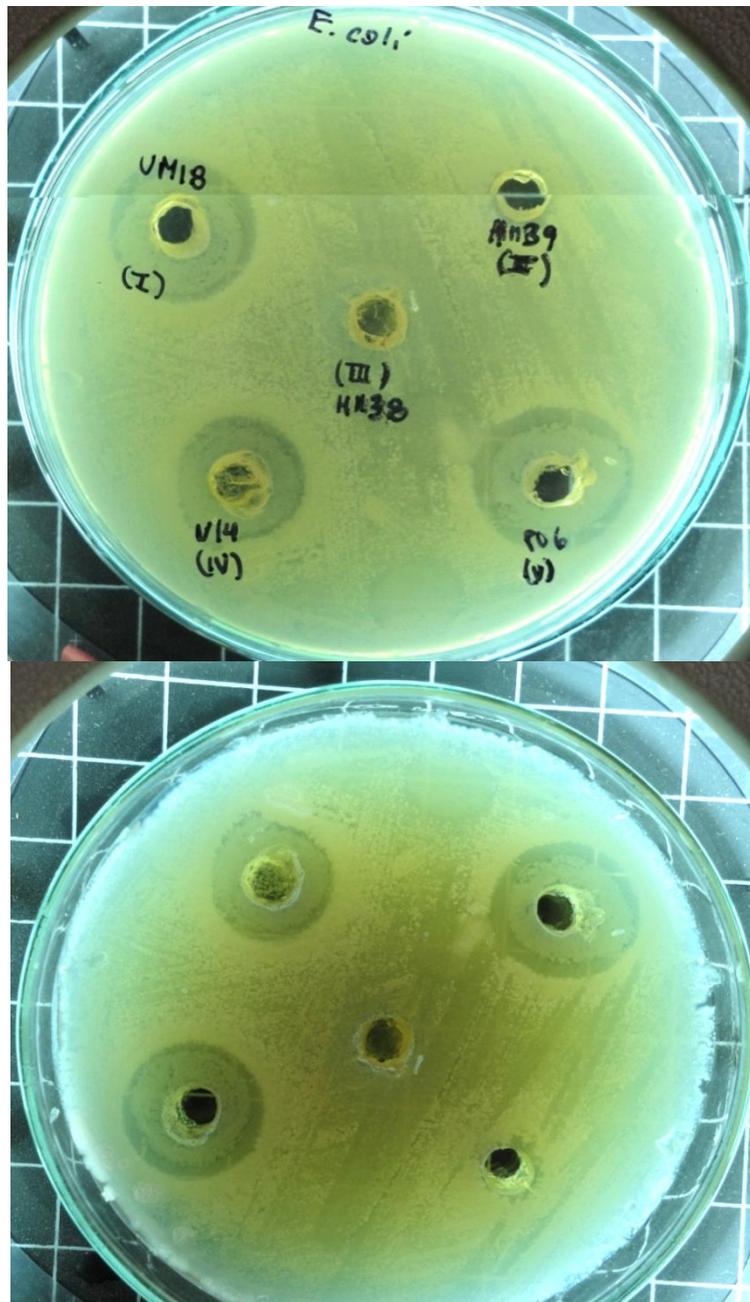
**Fig. N° 3:** Cepas de microorganismos patógenos indicadores *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* y *S. pyogenes*



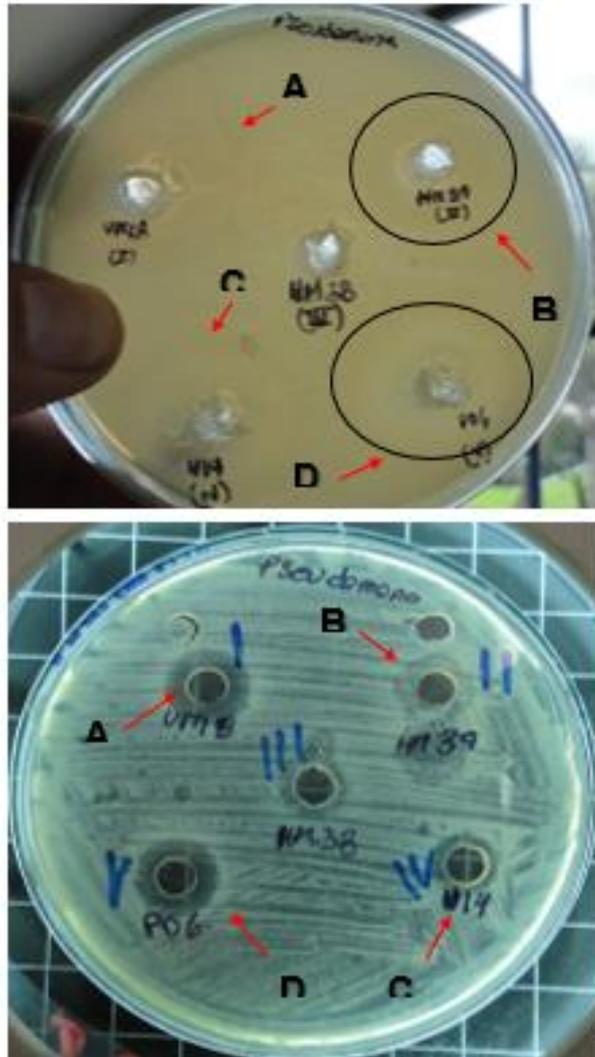
**Fig. N° 4:** Halos de inhibición frente a *S. aureus* producidos por cepas de Bacterias ácido lácticas aisladas de quesos provenientes de la Provincia de Huarochirí (Método de Difusión en Agar). Sobrenadantes libres de células neutralizados a pH 6.5 de A: cepa UM 18; B: cepa HM 39; C: cepa HM 38 y D: cepa P06



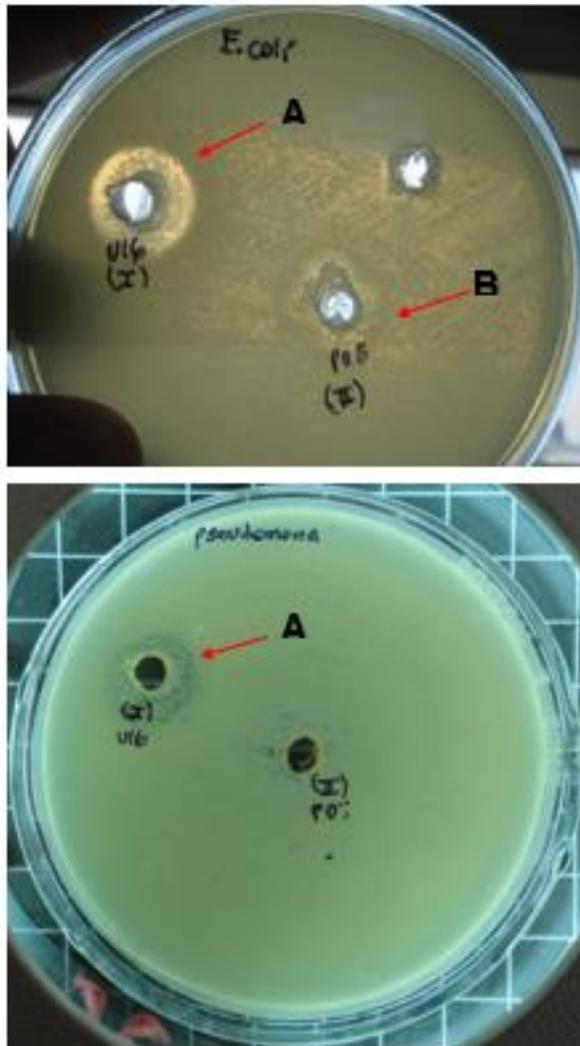
**Fig. N° 5:** Halos de inhibición frente a *S. pyogenes* producidos por cepas de Bacterias ácido lácticas aisladas de quesos provenientes de la Provincia de Huarochirí (Método de Difusión en Agar). Sobrenadantes libres de células neutralizados a pH 6.5 de A: cepa UM 18; B: cepa HM 38 y C: cepa P06



**Fig. N° 6:** Halos de inhibición frente a *E. coli* producidos por cepas de *Bacterias ácido lácticas* aisladas de quesos provenientes de la Provincia de Huarochirí (Método de Difusión en Agar). Sobrenadantes libres de células neutralizados a pH 6.5 de A: cepa UM 18; B: cepa U 14 y C: cepa P06.



**Fig. N° 7:** Halos de inhibición frente a *P. aeruginosa* producidos por cepas de *Bacterias ácido lácticas* aisladas de quesos provenientes de la Provincia de Huarochirí (Método de Difusión en Agar). Sobrenadantes libres de células neutralizados a pH 6.5 de A: cepa UM 18; B: cepa HM 39; C: cepa U 14 y D: cepa P06



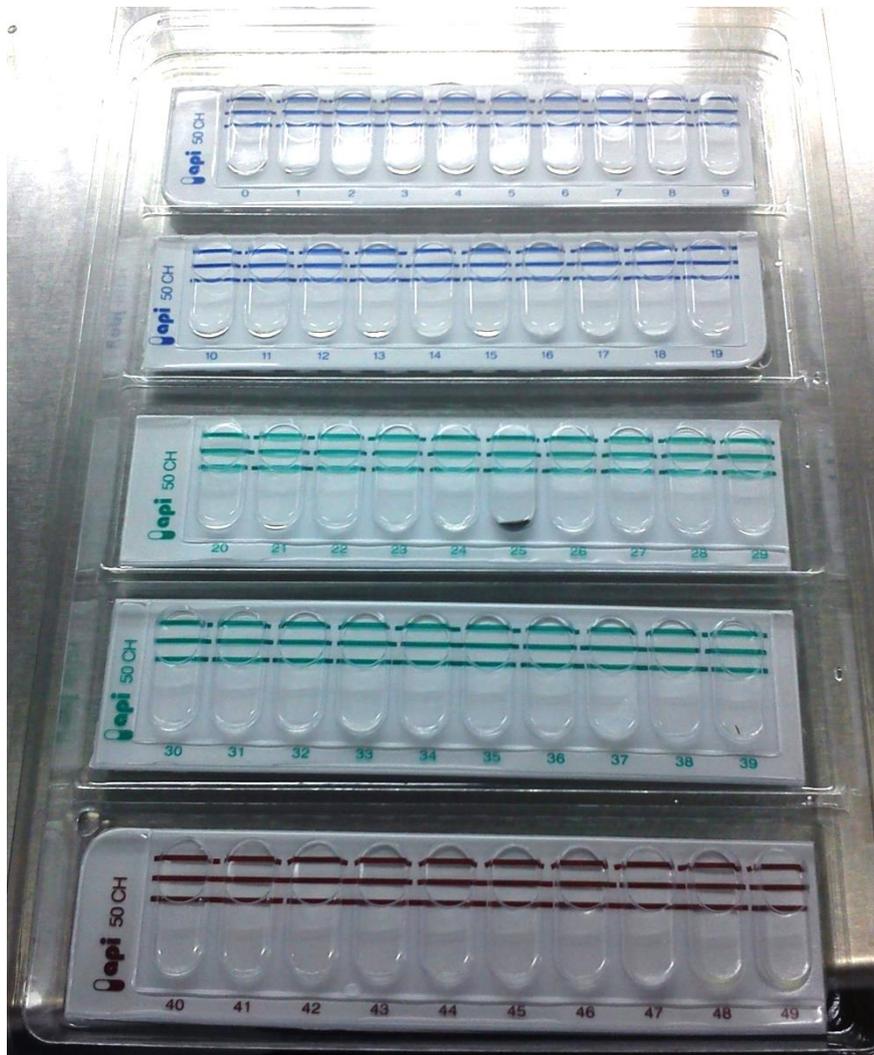
**Fig. N° 8:** Halos de inhibición frente a *P. aeruginosa* y *E. coli* producidos por cepas de *Bacterias ácido lácticas* aisladas de quesos provenientes de la Provincia de Huarochirí (Método de Difusión en Agar). Sobrenadantes libres de células neutralizados a pH 6.5 de A: cepa U16; B: cepa P05



**Fig. N° 9:** Kit api 50CH– BIOMÉRIEUX y api 50CH Medium, para la identificación Bioquímica de las Bacterias Lácticas (BAL)



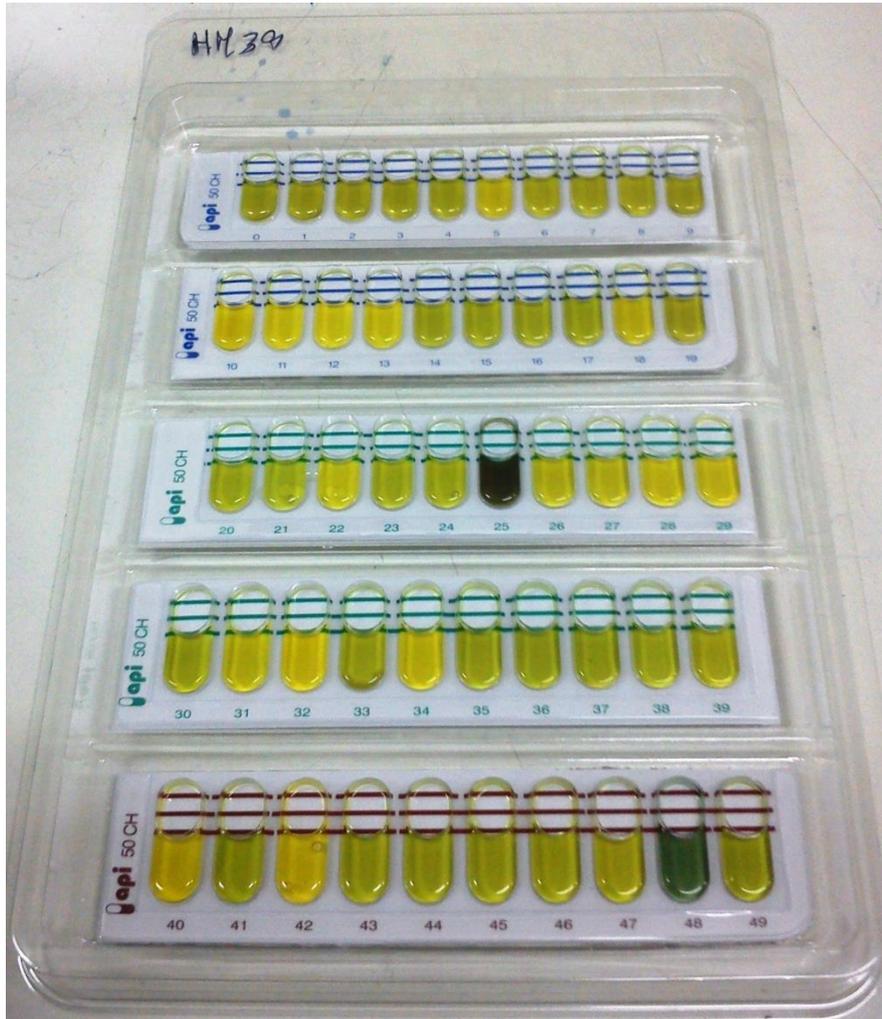
**Fig. N° 10:** Ampolla API 50 CHL Medium



**Fig. N° 11:** Galería api 50CH compuesta por 50 microtubos los cuales permitieron el estudio de la fermentación de substrato y la identificación de las especies de bacterias ácido lácticas (BAL).



**Fig. N° 12:** Ceba U14 identificada como *Lactococcus lactis ssp hordniae* incubada a 37 °C durante 24h.



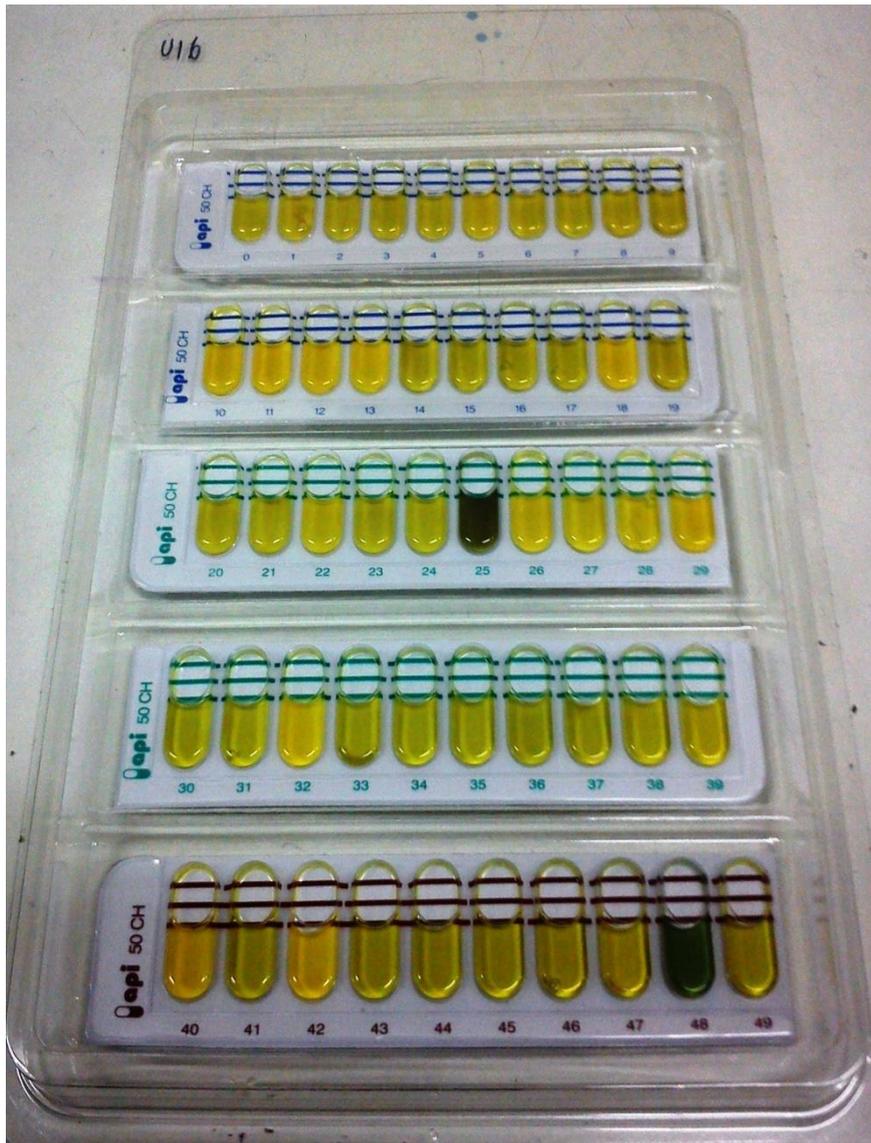
**Fig. N° 13:** Cepa HM 39 identificada como *Lactobacillus acidophilus* incubada a 37 °C durante 24h.



**Fig. N° 14:** Cepa P06 identificada como *Lactobacillus curvatus ssp curvatus*, incubada a 37 °C durante 24h.



Fig. N° 15: Cepa P05 identificada como *Lactobacillus helveticus* incubada a 37 °C durante 24h.



**Fig. N° 16:** Cepa U16 identificada como *Lactobacillus paracasei ssp paracasei*, incubada a 37 °C durante 24h



**Fig. N° 17:** Cepa UM18 identificada como *Lactobacillus rhamnosus* incubada a 37 °C durante 24h



**Fig. N° 18:** Cepa HM 38 identificada como *Lactobacillus brevis* incubada a 37 °C durante 24h

**Nota:**

- La identificación de especies se realizó al consultar la tabla de Identificación de la ficha técnica del Kit Api 50 CH Medium.
- En cada tubo se investigó la acidificación producida, que se tradujo por el cambio de color a AMARILLO del púrpura de bromocresol contenido en el medio.