

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* Y SUS
METABOLITOS CONTRA *Escherichia coli* O157 H:7

POR:

RAMÓN ERNESTO ZELAYA PADILLA

TESIS



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A.

DICIEMBRE, 2013

ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* Y SUS
METABOLITOS CONTRA *Escherichia coli* O157 H:7

POR:

RAMÓN ERNESTO ZELAYA PADILLA

FANNY MARADIAGA CARRANZA, ING.

Asesor(a) Principal

TESIS PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA
COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA ALIMENTARIA.

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A.

DICIEMBRE, 2013

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

Catacamas, Olancho

ACTA DE SUSTENTACIÓN

Los suscritos miembros del Comité Evaluador del Informe Final de la Práctica Profesional Supervisada certificamos que:

El estudiante **RAMÓN ERNESTO ZELAYA PADILLA** del IV Año de la Carrera de Tecnología Alimentaria presento su informe intitulado:

“ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* Y SUS METABOLITOS CONTRA *Escherichia coli* O157 H:7”

El cual a criterio de los evaluadores, _____el presente trabajo de investigación como requisito previo para optar al título de Licenciado en Tecnología Alimentaria.

Dado en la ciudad de Catacamas, Departamento de Olancho, a los ---- días del mes de noviembre del año dos mil trece.

ING. FANNY MARADIAGA
Asesor Principal

Dra. NELYS HERRERA
Asesor Auxiliar

Ph.D. CARLOS ULLOA
Asesor Auxiliar

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a **mi Dios** quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis padres **Edgardo Ernesto Zelaya** (Q.E.P.D) y **Norma Argentina Padilla** (Q.E.P.D) por haberme regalado la oportunidad de vivir, a pesar de su partida me ayudo a fortalecer mis fuerza para poderme formar como profesional.

A mi abuela **María Isabel Gallardo** (Q.E.P.D) y mi abuelo **Ricardo Antonio Hernández** quienes por ellos soy lo que soy, por sus consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mis primos **Claudia Patricia Castro Gallardo** y **David Castro Gallardo** que han sido como mis padres, y que han sabido comprenderme en momentos difíciles de mi vida y porque siempre han estado presentes apoyándome con mis necesidades económicas.

AGRADECIMIENTO

A la alma mater: **UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA** por darme la oportunidad de formar parte de esta gran familia, por formarme personal y profesionalmente.

A la empresa: **C & D** y la **Ing. Luisa Fernanda Rubiano** por permitirme realizar mi investigación en su laboratorio y por financiarme la realización de este trabajo.

A mis asesores de tesis: **Ing. Fanny Maradiaga, Ph.D Carlos Ulloa** y la **Dra. Nelys Herrera** por toda la colaboración brindada, durante la elaboración de este proyecto.

A una persona muy especial **Francis Daniela Medina**, que durante estos años de mi carrera ha sabido comprenderme en los buenos y malos momentos para continuar y nunca renunciar, gracias por su amor incondicional.

A mis hermanos (as) **Jenny Isabel Zelaya, Gressy Yolany Zelaya, Abner Jasiel Zelaya** y cuñado **Elmer Lobo** por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar. A mi sobrinos que han sido y es una de mi motivación, inspiración y felicidad.

A mis **tíos (as), primos (as)**, por estar siempre presentes y apoyarme en los momentos que los necesito siendo muy especiales, demostrándome sinceridad y comprensión.

A mis compañeros de la **Carrera de Tecnología alimentaria** y del **cuarto 6 de la H-V** por compartir momentos difíciles durante estos cuatro años de sacrificio y disfrutando todos aquellos momentos alegres.

CONTENIDO

	pág.
ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
CONTENIDO.....	iv, v, vi, vii
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	2
2.1. General.....	2
2.2. Específicos.....	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
3.1. Bacterias y su clasificación.....	3
3.1.1. Bacterias Gram positivas.....	4
3.1.2. Bacterias Gram negativas.....	5
3.2. Clasificación de las bacterias Gram positivos.....	6
3.2.1. Bacterias lácticas.....	6
3.2.2. Micrococos.....	6
3.2.3. Estafilococos.....	7

3.2.4.	Esporuladas.....	7
3.3.	Generalidades de las bacterias ácido lácticas.....	7
3.3.1.	Características de Bacterias ácido lácticas	8
3.3.2.	Bioquímica de bacterias ácido lácticas	9
3.3.3.	Requerimientos nutricionales de las bacterias ácido lácticas	12
3.3.4.	Géneros de las bacterias ácido lácticas.....	14
a.	El género <i>Leuconostoc</i>	15
b.	El género <i>Lactococcus</i>	15
c.	El género <i>Streptococcus</i>	15
d.	El género <i>Lactobacillus</i>	16
3.3.5.	Compuestos antimicrobianos producidos por las BAL	17
a)	Ácidos Orgánicos.	17
b)	Compuestos no proteicos.....	17
c)	Metabolitos de oxígeno.	18
d)	Bacteriocinas.	18
3.4.	Clasificación de las bacterias Gram negativas.....	20
3.4.1.	Enterobacterias	20
3.4.2.	Acromobacterias.....	21
3.4.3.	Micobacterias.....	21
3.5.	Microorganismos presentes en los alimentos	22
3.5.1.	Microorganismos patógenos.....	23
A)	<i>Escherichia coli</i>	23
B)	El género <i>Salmonella</i>	24
IV.	METODOLOGÍA.....	26
4.1.	Descripción del lugar	26
4.2.	Materiales y equipo.....	26
4.2.1.	Microorganismos	26

4.2.2.	Cultivos de crecimiento	27
4.2.3.	Equipo.....	27
4.2.4.	Equipos de protección personal y parámetros de seguridad.....	27
4.3.	Manejo del experimento	28
4.3.1.	Preparación de los medios de crecimiento	28
4.3.2.	Preparación de patógenos para la actividad antimicrobiana.....	29
4.3.3.	Proceso de fermentación.....	29
a)	Obtención y separación de células de bacterias ácido lácticas	30
4.3.4.	Evaluación de la capacidad antimicrobiana de <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> y sus metabolitos contra <i>E. coli O157 H: 7</i>	31
4.4.	Diseño experimental	31
4.4.1.	Los factores y niveles	31
4.5.	Variables a evaluar.....	33
4.5.1.	Diámetro de inhibición	33
4.6.	Análisis estadístico	33
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1.	Cambios de pH durante proceso de fermentaciones de las BAL (<i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus casei</i>)	34
5.1.1.	Control de pH durante el proceso de fermentación de <i>Lactobacillus fermentum</i>	34
5.1.2.	Control de pH durante el proceso de fermentación de <i>Lactobacillus casei</i>	35
5.2.	Análisis estadístico	37
5.2.1.	Determinación de la acción antimicrobiana de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus casei</i> y sus metabolitos contra a <i>E. coli O157H:7</i>	37
5.2.2.	Efecto del tiempo de fermentación <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus casei</i> sobre <i>E. coli O157:H7</i>	38

5.2.3. Efecto de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus casei</i> y sus metabolitos sobre <i>E. coli</i> O157H:7	39
VI. CONCLUSIONES.....	43
VII. RECOMENDACIONES	44
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXOS	53

LISTA DE CUADROS

	<i>Pág.</i>
Cuadro 1. Requerimientos nutricionales de algunas bacterias ácido lácticas	13
Cuadro 2. Factores que afectan el crecimiento y la supervivencia de <i>Escherichia coli</i> <i>O157:H7</i>	24

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1. Clasificación de las bacterias de acuerdo a la tinción de Gram	5
Figura 2. Rutas metabólicas en la producción de ácido láctico por bacterias	11
Figura 3. Incubación de bacterias ácido lácticas	29
Figura 4. Proceso de fermentación de las BAL.....	30
Figura 5. Diseño experimental del trabajo de estudio.....	32
Figura 6. Comportamiento de pH durante proceso de fermentación de <i>Lactobacillus fermentum</i>	35
Figura 7. Comportamiento de pH durante proceso de fermentación de <i>Lactobacillus casei</i> ..	36
Figura 8. Comparación de las medias de los halos de inhibición de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus casei</i> contra <i>E. coli O157H:7</i> en la variable tiempo de fermentación.	39
Figura 9. Comparación de las medias de los halos de inhibición de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus casei</i> contra <i>E. coli O157H:7</i> en la variable tipo de fermento.....	40

LISTA DE ANEXOS

	<i>Pág.</i>
Anexo 1. Bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas	54
Anexo 2. Procedimiento para la reconstitución de cultivos liofilizados.	56
Anexo 3. Cambios de pH durante proceso de fermentación de <i>Lactobacillus fermentum</i>	58
Anexo 4. Cambios de pH durante proceso de fermentación de <i>Lactobacillus casei</i>	59
Anexo 5. Análisis de varianza (ANAVA) del trabajo experimental	60
Anexo 6. Prueba de comparación de medias según Tukey para la variable Tiempo de fermentación	60
Anexo 7. Prueba de comparación de medias según Tukey para la variable Tipo de fermento.	60
Anexo 8. Prueba de comparación de medias según Tukey para la variable interacción Tipo de fermento * Hora de fermento.....	61
Anexo 9. Crioconservación de cepas con glicerol al 20%	62
Anexo 10. Crecimiento de <i>E. coli O157H:7</i> en placas Petri con agar EMB.....	62
Anexo 11. Célula de <i>Lactobacillus fermentum</i>	63
Anexo 12. Actividad antimicrobiana de <i>Lactobacillus fermentum</i> contra <i>E. coli O157H:7</i>	63

Zelaya Padilla, RE. 2013. Acción antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* y sus metabolitos contra *Escherichia coli* O157 H:7. Tesis Lic. Tecnología. Alimentaria. Universidad Nacional de Agricultura. Catacamas Olancho, Honduras, C.A. 63 pág.

RESUMEN

El estudio se realizó en el laboratorio de microbiología de la Empacadora de carnes C&D. Se evaluó la capacidad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* y sus metabolitos frente a *E. coli* O157H:7, teniendo dos factores de estudio; el tiempo de fermentación y el producto de fermento, se utilizó seis tiempos de fermentación, hora 0, 1, 2, 3, 4, y 5. La hora 0 corresponderá a las condiciones iniciales de fermentación. Los productos de fermento utilizados fueron; célula de *Lact. fermentum* + Metabolito, la célula de *Lact. fermentum*, célula de *Lact. casei* + Metabolito y la célula de *Lact. casei*, donde se obtuvieron 24 tratamientos con cuatro repeticiones por cada tratamiento y la variable respuesta que fue el halo de inhibición. Las bacterias ácido lácticas se hicieron crecer bajo el proceso de fermentación en sustrato comercial MRS, mediante fermentación discontinua durante 5 horas, sin aireación y a 33° C/100 rpm. Los datos se analizaron bajo un diseño estadístico factorial de 4 x 6. En la actividad antimicrobiana se demostró que los productos de fermento y el tiempo de fermentación tienen efectos significativos p-valor (P<0.05), sobre el halo de inhibición de *E. coli* O157H:7. Se encontró diferencias estadísticas p-valor (P<0.05) entre tratamientos, siendo la célula de *Lact. fermentum* + Metabolito y la hora de fermentación cinco los más efectivos contra *E. coli* O157H:7 con 2.10 cm de halo de inhibición. Los resultados obtenidos indican que *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* y sus metabolitos producidos pueden utilizarse en la industria alimentaria, como agentes bioprotectores frente a *E. coli* O157H:7, garantizando la reducción de las enfermedades transmitidas por los alimentos.

Palabras claves: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *E. coli* O157H:7, metabolito, fermentación.

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido utilizadas en la fermentación de los alimentos como una de las técnicas de conservación más antiguas practicadas por el hombre. De esta forma se han generado nuevas opciones que aseguran la conservación de alimentos perecederos como la leche o la carne, para generar productos de mayor vida útil como los quesos y embutidos, respectivamente (Yakult. S.f.).

El uso de BAL en la biopreservación de alimentos ha tomado gran importancia en los últimos años debido a la capacidad para controlar microorganismos patógenos y alterantes. La aplicación de cepas biopreservantes así como de los extractos y metabolitos producidos por ellas, han demostrado tener control sobre diversos microorganismos no deseados consiguiendo alargar la vida útil de los alimentos y dar seguridad contra bacterias que puedan afectar la salud del consumidor (Vásquez *et. al.* 2009).

Las BAL que comprenden un número elevado de bacterias Gram-positivas cuya característica común es la producción de ácido láctico a partir de los carbohidratos. El grupo de bacterias lácticas asociadas con los alimentos incluyen cocos de géneros: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y bacilos de los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium* (Vásquez 2012).

En este trabajo se tuvo como propósito evaluar la capacidad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* y sus metabolitos contra *E. coli* O157:H7, patógeno deteriorador de alimentos, este trabajo experimental que representa una importante alternativa de investigación como una estrategia para fortalecer la calidad e inocuidad de la industria alimentaria del país.

II. OBJETIVOS

2.1. General

- Evaluar la acción antimicrobiana de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus fermentum* y sus metabolitos contra una cepa de *E. coli O157H:7* patógeno gram negativo principal productor de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's).

2.2. Específicos

- Determinar el tiempo de fermentación donde se tiene la mayor acción antimicrobiana de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus fermentum* contra *E. coli O157 H: 7*, patógeno gram negativo principal productor de ETA's.
- Determinar que producto de la fermentación de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei* posee la mayor actividad antimicrobiana frente a *E. coli O157H:7* patógeno gram negativo principal productor de ETA's.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Bacterias y su clasificación

Las bacterias son células procariotas, esto es, que no tienen un núcleo verdadero, ya que su genoma (ADN) está constituido por un cromosoma gigante supe desarrollado para hacerlo compacto, que suele denominársele nucleoide; pero carece de una membrana nuclear que le rodee, por lo cual no constituye una organela identificable como es el núcleo de las células eucariotas. El citoplasma de los procariotas está rodeada por una membrana citoplasmática que, a su vez, está cubierta por una pared bacteriana lo suficientemente rígida y fuerte como para conferirle una forma definida a la bacteria y hacerla resistente a cambios importantes de presión osmótica; por eso, pueden sobrevivir en medios isotónicos como los fluidos de nuestro organismo o en el agua, incluso en agua destilada, en orina y en agua de mar (Hernández 2002).

Las bacterias son seres vivos que nacen, crecen, se reproducen y mueren. Están presentes ampliamente en: tierra, suelo, agua, piel, pelo, boca, nariz, tracto intestinal, ambiente, etc. La mayor parte de las bacterias patógenas tienen un tamaño medio comprendido entre 0.5 y 5 μ , no tienen dificultad para ser cultivadas in vitro en el laboratorio. Las bacterias como todo ser vivo, necesitan de nutrientes, oxígeno, agua, y temperaturas adecuadas para poder crecer y multiplicarse (Pascual 2005).

Las bacterias presentan tres tipos morfológicos típicos: las formas esféricas llamados cocos; las cilíndricas o bastoncitos denominados bacilos, y las que presentan forma de espiral o resorte llamados espirilos (García s.f.).

Entre las bacterias, la pared celular varía en su complejidad arquitectónica. Esta diferencia sirve para para dividir las en dos grandes grupos: las bacterias Gram positivas y las Gram negativas (García s.f.).

La coloración de Gram fue ideada por Christian Gram en 1884, la cual las bacterias Gram positivas retienen el colorante violeta en la tinción luego de un proceso de decoloración con éter-cetona, y por lo tanto, se ven teñidas de este color, en tanto, las Gram negativas se decoloran y se contratiñen de rosado con safranina. El segundo colorante de esa tinción. Entonces, con la tinción de Gram, las bacterias Gram positivas aparecen de color violeta o azul oscuro y las Gram negativas aparecen de color rosado (Hernández Chavarría 2002).

Según García Martos *et al.* (1994) la coloración de Gram tiene fundamental importancia en la diferencia morfológica y taxonómica. Las bacterias se clasifican en dos grandes grupos según retengan o no el colorante de base usado en la tinción, que es el violeta de genciana o el cristal violeta:

3.1.1. Bacterias Gram positivas

Estas bacterias aparecen con el citoplasma teñido uniformemente de color azul o violeta (García Martos *et al.* 1994). En la mayoría de las bacterias Gram positivas están compuestas por varias capas de peptidoglucano que conforman una estructura gruesa y rígida. Además la pared celular estas bacterias contiene ácidos teicoicos, que están compuestos principalmente por un alcohol y fosfato. Existen dos clases de ácidos teicoicos; el ácido lipoteicoico que abarca toda la capa de peptidoglucano y esta unidad a la membrana plasmática y el ácido teicoico mural que está unido a la capa de peptidoglucano (Forbes *et al.* 2009).

3.1.2. Bacterias Gram negativas

Estas bacterias se tiñen de rojo por el colorante usado como contrastador (fuchina, safranina) (García Martos *et. al.* 1994). Las paredes de las bacterias Gram negativas tienen un contenido relativamente bajo de peptidoglucano, que suele sobrepasar del 5 al 10% del peso de la pared y tienen una capa externa que posee el grosor y estructura fina (Stanier *et. al.* 1992).

La diferencia entre unas y otras radica en la composición química de la pared celular y su permeabilidad. La pared de las Gram negativas es más delgada y presenta un contenido lipídico diez veces mayor que el de las Gram positivas, lo cual dificulta la tinción y la retención del colorante en el citoplasma (García Martos *et. al.* 1994).

Las bacterias Gram positivas y negativas no solo se diferencian por esa característica. Existen además otras características tanto bioquímicas como morfológicas. Por ejemplo, todas las bacterias con flagelos polares son Gram negativas y las bacterias Gram positivas son más sensibles a los antibióticos (García s.f.).

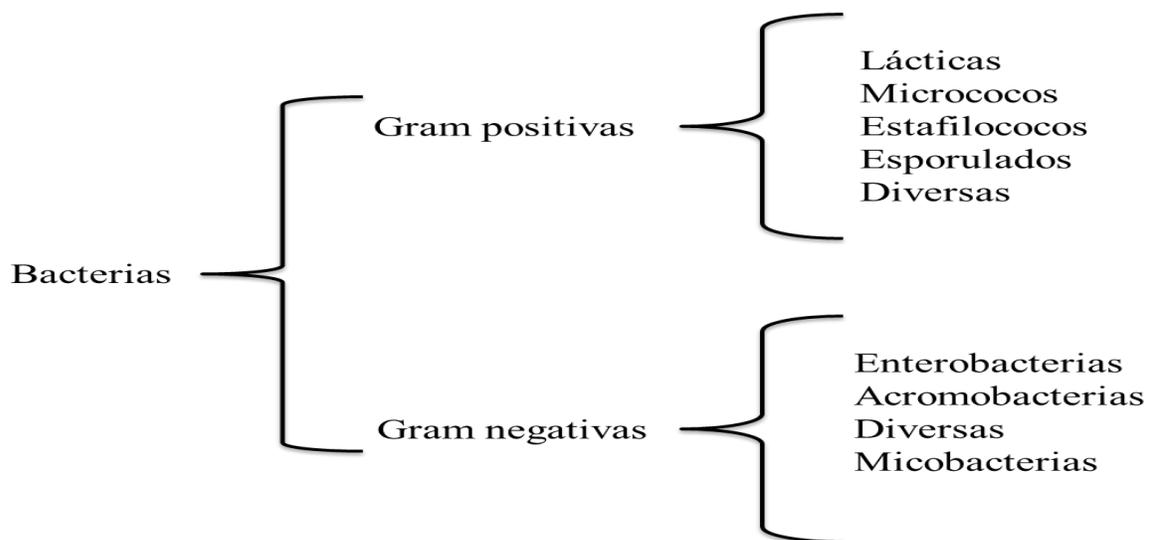


Figura 1. Clasificación de las bacterias de acuerdo a la tinción de Gram

Fuente: Rodríguez y Echeverría (2009).

3.2. Clasificación de las bacterias Gram positivos

Son en general quimio heterótrofas, aerobias o anaerobias (fermentadoras). Se suelen subdividir en función de que sean unicelulares o que formen micelios en su crecimiento y pueden presentarse en forma esférica (*cocos*) o alargada (*bacilos*) (Marín Galvin 2003).

3.2.1. Bacterias lácticas

Las bacterias del ácido láctico son organismos inmóviles, de forma bacilar o esférica unidos por un conjunto de propiedades metabólicas y nutricionales poco corriente. Su nombre deriva del hecho de que sintetizan ATP a través de fermentaciones de carbohidratos que dan como ácido láctico como principal (y a veces único) producto final. (Stanier *et al.* 1992).

3.2.2. Micrococos

Los micrococos son células bacterianas esféricas de diámetro comprendido entre 0,5 y 3 μm que típicamente aparecen dispuestas en tétradas. Estas bacterias generalmente son organismos saprofitos, están presentes normalmente en la microflora cutánea, productos lácteos, agua y suelo. Los micrococos son aerobios estrictos y termoresistentes, durante la maduración desciende su número y son débilmente fermentadores, forman parte de la flora inocua que contamina la leche cruda, tiene poca actividad enzimática por lo tanto son de muy poca importancia como agentes adulteradores en leche (Rosales Urbano *et al.* 2009).

3.2.3. Estafilococos

Los estafilococos son cocos Gram positivos de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, con agrupación irregular que semejan racimos de uvas como consecuencia de su división irregular en los tres planos del espacio. Son microorganismos aerobios y anaerobios facultativos inmóviles y no esporulados, pero bastante resistentes al calor, desecación, concentraciones salinas, estos gérmenes se desarrollan bien en medios de cultivos, son fermentadores de hidratos de carbono y toleran altas concentraciones salinas. Los estafilococos se diferencian del género *Micrococcus* por ser solo aerobios y oxidar azúcares. Se los encuentra como comensales en muchos individuos. Las especies más frecuentemente patógenas son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*. Los estafilococos ejercen su acción patógena en cualquier órgano o tejido (Negroni 2009).

3.2.4. Esporuladas

Estas bacterias son las únicas que forman una endospora, que tiene la importante propiedad de resistir altas temperaturas, mientras las otras bacterias se destruyen generalmente por debajo de 80°C, las esporuladas solo mueren por encima de 100°C, tiene por ello una importancia tecnológica a lo que se refiere a las conservas de productos alimenticios no adicionadas de agentes conservadores (Negroni 2009).

3.3. Generalidades de las bacterias ácido lácticas

El término bacterias lácticas engloba a un grupo heterogéneo de microorganismos cuya característica definitoria es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares. Las bacterias lácticas se han venido utilizando inadvertidamente durante miles de años para la producción de alimentos tales como queso y yogur. Sin embargo, no fue hasta

mediados del siglo XIX cuando Louis Pasteur demostró que la producción de ácido láctico en fermentaciones se debía a la acción de microorganismos (fermentos lácticos). El aislamiento y obtención de un cultivo puro de *Bacterium lactis* por Joseph Lister marcó el inicio del estudio microbiológico de las bacterias lácticas (Aznar y Zúñiga s.f.).

Las bacterias ácido lácticas se encuentran sobre las plantas en la naturaleza, pero algunas especies están en la leche en grandes cantidades. Otras se encuentran en los intestinos de los animales. El grupo incluye bacilos y cocos, que pueden formar cadenas de longitud variable pero que nunca dan lugar a esporas. La mayor parte de ellas mueren por calentamiento a 70 °C, aunque la temperatura letal para alguna es de hasta 80 °C (Bylund, s.f.).

En 1900 Henry Tissier aisló de las heces de un lactante la primera bifidobacteria a la que llamó *Bacillus bifidus*. Se trataba de un organismo Gram positivo y productor de ácido láctico por lo que en la primera clasificación se incluyó con las bacterias lácticas. En 1917 Winslow propuso la familia *Lactobacillaceae* para agrupar bacterias con los siguientes rasgos: bacilos Gram positivos, a menudo largos y delgados, inmóviles, no esporulados, comúnmente producen ácido láctico a partir de azúcares, pueden producir gas (dióxido de carbono), no producen hidrógeno, ocasionalmente termófilos, difícilmente cultivables en medio gelificado incubado en atmósfera microaerófila. Dentro de esta familia se incluía *Bacillus bifidus* (Aznar y Zúñiga s.f.).

3.3.1. Características de Bacterias ácido lácticas

Las bacterias lácticas forman una familia muy heterogénea cuyo hábitat es la leche y se caracterizan por las siguientes propiedades generales; Gram positivas, no esporuladas, microaerofilicas o anaerobias facultativas, no reducen los nitratos, no producen catalasa, con poca actividad proteolítica y fermentan los azúcares en diferentes condiciones (AAPPA 2004).

Tienen como característica común como la de producir ácido láctico como catabólito único o mayoritario en la fermentación de los azúcares. Otra característica de las bacterias ácido lácticas que abarca tanto a bacilos como a cocos, es la de presentar unos requerimientos nutritivos complejos. Esto lleva la necesidad de utilizar medios especiales como agar de sangre, el Edwards, el de jugo de tomate o el de rugosa (Pares y Juárez 2002).

Las bacterias ácido lácticas son todas anaerobias aerotolerantes que crecen fácilmente sobre la superficie de medios sólidos expuestos al aire. Sin embargo, son incapaces de sintetizar ATP por respiración, lo cual es un reflejo de su incapacidad para sintetizar citocromos y otros enzimas que contengan grupos hemo (Stanier *et al.* 1992).

Otra característica fisiológica distintiva de las bacterias ácido lácticas es su elevada tolerancia a los ácidos. Aunque las bacterias cocoides del ácido láctico pueden iniciar su crecimiento en medios neutros o alcalinos, la mayoría de las formas bacilares no pueden crecer en medios con un pH inicial mayor a seis. El crecimiento de las bacterias ácido lácticas continúa hasta que el pH ha bajado, por la fermentación, a un valor de cinco o menos (Stanier *et al.* 1992).

3.3.2. Bioquímica de bacterias ácido lácticas

La principal característica metabólica de las BAL es la producción de ácido láctico resultado de la fermentación de los carbohidratos, donde el ácido láctico presenta varios efectos beneficiosos en la elaboración de un alimento fermentado, por un lado junto al bajo pH, posee efecto bacteriostático y bactericida sobre bacterias patógenas o alterantes, mejorando la seguridad y alargando la vida media del producto, por otro lado contribuye a las características organolépticas finales, como la textura o el sabor (Rodríguez Gómez 2006).

Las bacterias ácido lácticas podían dividirse en dos subgrupos bioquímicos, que se distinguen por los productos formados a partir de la glucosa (Anexo 1). Los homofermentativos convierten la glucosa, de modo casi cuantitativa, en ácido láctico; los heterofermentativos la convierten en una mezcla equimolecular del ácido láctico, etanol y CO₂. El modo de fermentar la glucosa puede determinarse de manera muy simple mediante la detección de la producción de CO₂. Sin embargo, como la cantidad producida por los heterofermentadores es muy pequeña (un mol por un mol de glucosa fermentada) su detección requiere un procedimiento especial (Stanier *et. al.* 1992).

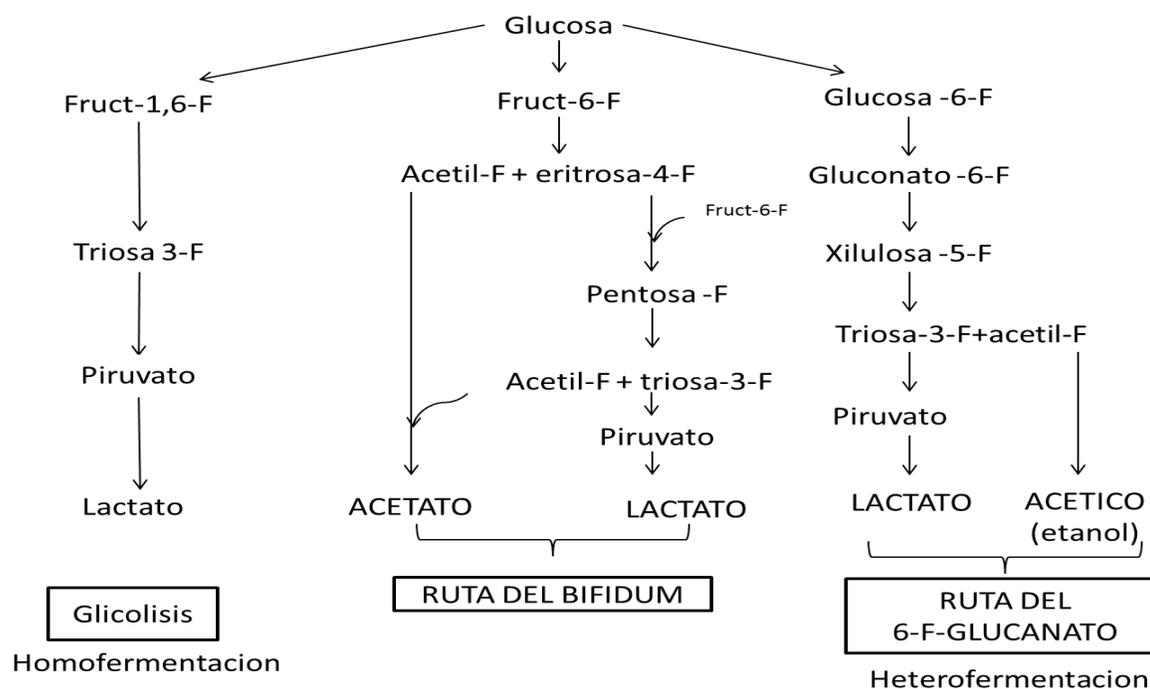
Todas las bacterias ácido lácticas son sacarolíticas y deficientes en muchas rutas biosintéticas. En consecuencia presentan requerimientos nutricionales complejos que los obliga a restringirse a medios ambientales ricos en nutrientes como el tracto intestinal y la leche. Existen tres rutas metabólicas de degradación de carbohidratos a láctico que se presentan en la figura 2. La ruta homofermentativa genera láctico como único producto con un rendimiento de dos moles por una de glucosa, y es por, consiguiente la de interés en producción (García *et. al.* 2004).

La ruta heterofermentativa resulta en la acumulación de etanol y CO₂ (en ocasiones también acético) en cantidades equimolares de láctico. Esta transformación ocurre a través del esquema metabólico de las pentosas. Finalmente, *Bifidobacterium bifidum* produce 1.5 moles de acetato y una de lactato por mol de glucosa a través de un camino especial conocido como la ruta de bifidum (García *et. al.* 2004).

Los heterofermentativos convierten la glucosa en una mezcla equimolecular de ácido láctico, etanol y CO₂. El modo de fermentar la glucosa puede determinarse de manera muy simple mediante la detección de producción de CO₂. Los heterofermentadores no pueden utilizar la ruta Embden-Meyerhof ya que carecen de una enzima clave, la fructosa difosfato aldolasa, que cataliza la escisión del azúcar-fosfato. Estos organismos catabolizan la glucosa a través de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato. Una de las principales diferencias entre las dos rutas está en sus rendimientos netos de ATP: dos moles por

molécula de glucosa fermentada en la ruta homofermentativa y solo un mol a través de la ruta heterofermentativa (Stanier *et al.* 1992).

La ruta de fermentativa de *Bifidobacterium bifidum* es única. Como en la vía de Embden-Meyerhof, la glucosa se convierte en fructosa-seis-fosfato, que sufre una rotura C₂-C₄ acompañada por una incorporación de fosfato inorgánico véase en la figura 2. Se inicia luego una compleja serie de interconversiones de azúcares fosfato mediante una reacción eritrosa cuatro-fosfato y la fructosa seis-fosfato, produciendo al final dos moles de acetil fosfato y dos moles de gliceraldehido tres-fosfato. El acetil fosfato se convierte en acetato y la triosa fosfato se convierte, vía piruvato, en L-lactato. Desde el punto de vista energético, esta fermentación es ligeramente más favorable que la fermentación homoláctica, ya que suministra cinco moles de ATP por cada dos moles de glucosa fermentada (Stanier *et al.* 1992).



Rutas metabólicas en la producción de láctico por bacterias

Figura 2. Rutas metabólicas en la producción de ácido láctico por bacterias

Fuente: García *et al.* (2004).

Por su naturaleza fermentativa, las bacterias lácticas producen compuestos reducidos a partir del piruvato, un producto intermedio de la glucólisis. Los compuestos producidos son característicos de las bacterias lácticas, como los ácidos D, L-láctico y acético y numerosos compuestos volátiles de gran interés en la industria alimentaria, entre ellos, el acetaldehído o el diacetilo. Las proporciones en que estos compuestos son producidos varían en función de las condiciones ambientales, pero sobre todo de la cepa utilizada de forma que aquellas especies o cepas que más eficazmente metabolizan carbohidratos, no son necesariamente las que más compuestos de interés producen (Rodríguez Gómez 2006). La última etapa de la fermentación por la ruta glucolítica en las BAL es la conversión del piruvato en ácido láctico por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Sin embargo, existen rutas alternativas para el metabolismo del piruvato, que se activan dependiendo de diversos factores: disponibilidad de azúcares, presencia de oxígeno, pH, temperatura. Este metabolismo alternativo del piruvato genera diversos compuestos diferentes al ácido láctico, por lo que se dice que en esas condiciones la fermentación deja de ser homoláctica (aprox. 100% producción de ácido láctico) para pasar a ser ácido mixto (producción de ácido láctico más acetato, diacetilo, acetaldehído, etc.) (Rodríguez Gómez 2006).

3.3.3. Requerimientos nutricionales de las bacterias ácido lácticas

Siendo muy exigentes en cuanto a su nutrición todas fermentan glucosa y hay algunas que pueden multiplicarse en ausencia de azúcares como lo es *Leuc. citrovorum*. Las BAL requieren de aminoácidos como fuente de nitrógeno, siendo las sales amoniacales las que estimulan su desarrollo y una diversidad de factores de crecimiento. Esta demanda de nutrientes permite diferenciar algunas especies (Stamer; *et al.* citado por Mora Peñaflores y García Guerrero 2007).

A pesar de la utilidad que tienen las BAL en la industria alimenticia, es reconocida la dificultad de cultivarlas por la necesidad de una gran cantidad de requerimientos

nutricionales como se muestra en el cuadro uno. Las vitaminas son los factores de crecimiento que se necesitan con mayor frecuencia, ya que funcionan formando parte de coenzimas. Las principales vitaminas requeridas por los microorganismos son la tiamina (vitamina B₁), biotina, piridoxina (vitamina B₆) y cobalamina (vitamina B₁₂) (Madigan y Col. citado por Mora Peñaflor y García Guerrero 2007).

Cuadro 1. Requerimientos nutricionales de algunas bacterias ácido lácticas

Exigencias para crecimiento					
Metabolitos	<i>Lc. lactis</i> <i>Subesp.</i> <i>Lactis</i>	<i>Lc. lactics</i> <i>Subesp.</i> <i>diacetylactics</i>	<i>Lc. lactics</i> <i>Subesp.</i> <i>Cremonis</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Aminoácidos					
Asp	-	-	-	+	+
Thr	-	-	-	?	?
Ser	-	?	+/-	?	?
Glu	+	+	+	+/-	+
Gly	-	?	+/-	?	?
Pro	-	?	+	?	?
Ala	-	?	+/-	?	?
Cys	S	S	+	+	S
Val	+	+	+	+	+
Met	+	+	+	+/-	+
Ile	+	+	+	+/-	+
Leu	+	+	+	+	+
Tyr	?	?	?	+/-	+
Phe	+/-	?	+	?	?
Lys	-	-	+/-	+	+
His	+	+	+	+	+
Trp	?	+/-	?	?	?
Arg	+/-	+/-	+/-	?	?
Vitaminas					

B12	+	+	+	+	+
Biotina	+	+	+	+	+
Nicotiamina	+	+	+	+	+
Pantotenato	+	+	+	+	+
Riboflavina	+	+	+	+	+
Tiamina	+	+	+	+	-
Priridoxal	+	+	+	+	-
Ácido fólico	+	+	+	+	-
Ácidos orgánicos					
Ácido acético	+	+	+	?	?
Ácido oleico	+	+	+	?	S
Ácido orótico	?	?	?	?	S
Acido fórmico	?	?	?	?	S

Asp=Acido aspártico, Thr=Treonina, Ser=Serina, Glu=Acido glutámico, Gly=Glicina, Pro=Prolina, Ala=Alanina, Cys= Cisteina, Val=Valina, Met=Metionina, Ile=Isoleucina, Leu=Leucina, Tyr=Tirosina, Phe=Fenilalanina, Lys=Lisina, His=Histidina, Trp= Triptofano, Arg= Arginina.

Fuente: Marshall y Law; Thomas y Prichard citado por Mora Peñaflor y García Guerrero (2007).

3.3.4. Géneros de las bacterias ácido lácticas

Actualmente en la comunidad científica, las bacterias ácido lácticas se acepta clasificarlas en los géneros siguientes; *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Oenococcus*. Las que se utilizan en la industria láctea por que se desarrollan bien en la leche son las que pertenecen a los géneros siguientes: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* (Lagarriga s.f.).

Según Lagarriga (s.f.) los géneros que se describen brevemente a continuación son los que tienen mayor importancia en la microbiología de los alimentos:

a. **El género *Leuconostoc***, del grupo de BAL, son cocos Gram positivos resistentes a vancomicina, distribuidos en la naturaleza y empleados en la industria alimentaria. Clásicamente considerado inocuo para la especie humana, se lo ha implicado en diversas patologías en sujetos susceptibles; se lo aisló cada vez con más frecuencia y con un amplio perfil de patogenicidad, por lo que en la actualidad se clasifica como patógeno oportunista emergente. La puerta de entrada no ha sido estudiada en profundidad; las más probables son la digestiva, en intestinos alterados, y la cutánea, a través de la pérdida de su integridad. Otras formas descritas son contaminaciones de la nutrición parenteral y enteral, esta última asociada sobre todo al uso de sondas gástricas. Los aislados casos descritos en pacientes inmunocompetentes sin factores de riesgo involucran, sobre todo, a lactantes sanos (Martínez Pajares *et al.* 2012).

b. **El género *Lactococcus*** es un tipo de bacteria ácido láctica, es la mayor especie de cinco incluidas como miembros de los grupos N del género *Streptococcus* y especies relacionadas. Estas tienen una forma típicamente esférica u ovoide, de 0.5 a 1.2 μm por 0.5 a 1.5 μm , y se agrupan en pares o en cadenas cortas. Estos no son formadores de esporas y no tienen movimiento. Los *Lactococcus* son comúnmente usados en la industria de la leche y la manufactura de productos de leche fermentada. Ellos pueden usar cultivos simples de cepas iniciadoras o cultivos de mezclas de cepas con otras bacterias ácido lácticas como los *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Vargas Cortes *et. al.* 2006).

c. **El género *Streptococcus*** son un género de bacterias Gram positivas, esféricas de menos de 2 μm de tamaño. Estas bacterias crecen en cadenas o pares, donde cada división celular ocurre a lo largo de un eje. De ahí que su nombre, del griego streptos, significa que se dobla o retuerce con facilidad, como una cadena (Alarcón 2011).

Según Alarcón (2011) las características generales del género *Streptococcus* son las siguientes:

- Son bacterias anaerobias facultativas
- La mayoría de las especies crece en un ambiente con CO₂ (5%), con capnofilos
- Son homofermentativos, producen ácido láctico a partir de la fermentación de la glucosa sin formación de gas
- Son catalasa negativo
- Son oxidasa negativo
- Forman cadenas cuando crecen en medios líquidos

d. **El género *Lactobacillus*** está formado por bacterias Gram positivas de forma bacilar que suelen formar largas cadenas. Estas bacterias tienen diferentes hábitats, se pueden encontrar formando parte de la flora normal de las mucosas de la boca o de la vagina, y también se las puede encontrar en la leche. Distintas cepas de *Lactobacillus* son capaces de fermentar la lactosa (un azúcar) de la leche mediante una fermentación ácida que provoca una bajada del pH (que provoca por ejemplo la coagulación de la leche, mediante la desnaturalización de sus proteínas). De hecho son bacterias acidófilas, crecen mejor en ambientes ácidos (La ciencia y sus demonios 2011).

En la actualidad diferentes cepas de *Lactobacillus*, así como otras de *Streptococcus* y de *Bifidobacterium* han sido propuestas como prebióticos, microorganismos con capacidades saludables. Se ha sugerido que son capaces de proteger frente a infecciones o al estrés oxidativo. Su participación en estos procesos, así como su verdadera eficacia todavía está en un amplio debate dentro de la comunidad internacional, pero eso ya forma parte del tema de otros futuros posts (La ciencia y sus demonios 2011).

3.3.5. Compuestos antimicrobianos producidos por las BAL

Estas bacterias producen otras sustancias antagonistas dentro de las cuales se destacan el diacetilo, peróxido de hidrógeno, acetaldehído, compuestos no proteicos de bajo peso molecular y las bacteriocinas (Vásquez *et. al.* 2012).

a) **Ácidos Orgánicos:** Los ácidos orgánicos contribuyen al desarrollo de sabor, aroma y textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos alterantes. La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos y del pH es complementaria, siendo la fracción no disociada de los ácidos orgánicos la que posee una mayor actividad inhibidora debido a su naturaleza lipofílica, ya que pueden atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma. Estas moléculas pueden ejercer dos efectos: por un lado interfieren con funciones celulares, como puede ser la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa, por otro lado, la disociación de los ácidos orgánicos provoca el incremento de protones en el interior celular. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula (Vásquez *et. al.* 2012).

La acción de los ácidos orgánicos añadidos es la de potenciar los mecanismos fisiológicos de prevención. Los ácidos orgánicos de cadena media (C6 a C12 caproico, caprilico, caprico y laurico), parecen tener una actividad anti *Salmonella* más acentuada que los ácidos de cadena corta (fórmico, acético, propionico y butírico) (Faura s.f.).

b) **Compuestos no proteicos:** Entre los compuestos no proteicos que producen las BAL durante su crecimiento se encuentra la reuterina. Esta sustancia a diferencia de las bacteriocinas y el peróxido, solo se produce por *Lactobacillus reuteri*, aislado del tracto gastrointestinal de personas y animales; su potencial tóxico aún no se ha evaluado, aunque por su naturaleza existen dudas acerca de su posible utilidad en la industria alimentaria. Su actividad antimicrobiana es extraordinariamente amplia, afectando a bacterias Gram

positivas, Gram negativas, levaduras, mohos y protozoos. La reuterina se forma durante la utilización anaerobia del glicerol e inhibe la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa involucrada en la síntesis del DNA, lo que determina su amplio espectro antimicrobiano (Vásquez *et. al.* 2012).

c) **Metabolitos de oxígeno:** El crecimiento de BAL en medios aerobios conduce a la formación de varios metabolitos del oxígeno como: peróxido de hidrógeno, aniones súper óxido y radicales libres, que poseen un efecto bacteriostático y bactericida frente a la flora láctica y no láctica. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) funciona como un oxidante produciendo radicales libres que atacan los componentes celulares esenciales, lípidos, proteínas y DNA (Vásquez *et. al.* 2012).

Se ha reportado que el H_2O_2 producido por *Lactobacillus* y *Lactococcus* es capaz de inhibir cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.* y varios microorganismos psicrótrofos en alimentos. En leche cruda el H_2O_2 activa el sistema lactoperoxidasa, produciendo hipotiocianato ($OSCN^-$), oxiácidos (O_2SCN^- y O_3SCN^-) y productos intermediarios de oxidación que tienen un amplio espectro de inhibición contra bacterias Gram negativas y Gram positivas (Yang citado por Ramírez Cuenca 2005)

d) **Bacteriocinas:** Este es el metabolito sobre el cual se han centrado la mayor parte de estudios en los últimos años, desarrollándose diversas investigaciones en torno a su detección, producción, purificación, forma de acción, caracterización bioquímica, propiedades bactericidas, microorganismos inhibidos o sensibles y aplicación con éxito en la biopreservación de alimentos (Vásquez *et. al.* 2012).

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana producidos por síntesis ribosomal y son segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores. Estas sustancias con frecuencia actúan frente a las bacterias más estrechamente relacionadas. Sin embargo estudios recientes afirman que

también pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos (Monroy Dosta *et. al.* 2009).

Las bacteriocinas de bacterias lácticas son generalmente estables a pH ácido o neutro, indicando una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen. Además algunos extractos de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* presentan estabilidad al calentamiento a 50 y 80 °C, propiedad que es importante para asegurar el control de microorganismos en algunos procesos de la industria alimentaria. Algunos autores han considerado que el espectro de inhibición de estas proteínas es reducido, generalmente sobre microorganismos relacionados taxonómicamente, de forma que presentan actividad bactericida solamente frente a cepas sensibles (Vásquez *et. al.* 2012).

Según Monroy Dosta *et. al.* (2009) y Vásquez *et. al.* (2012) la clasificación de las bacteriocinas de acuerdo a características físicas, químicas y genéticas es descrita por varios autores que coinciden en mencionar las siguientes clases:

❖ **Clase I - Lantibióticos:** son pépticos pequeños (menos de 5000 Da), que contiene en su estructura aminoácidos atípicos o modificados caracterizada por la presencia de aminoácidos no comunes como lantionina, metillantionina y α aminoácidos insaturados como dehidroxilamina y dehidrobutirina, referenciados como lantibióticos. A este grupo pertenece la nisina, que es la bacteriocina mejor caracterizada, y se comercializa para uso como aditivo alimentario. Su aplicación en alimentos es amplia, pues actúa adecuadamente a pH ácido lo que permite su uso en productos fermentados. Otros ejemplos de este grupo son la lacticina 481 y lacticina S.

❖ **Clase II:** son péptidos pequeños termoestables (menos de 10000 Da). Ej. Lactacina B, Lactocina 27. Esta característica de termorresistencia parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por pépticos pequeños que no presentan estructura terciaria.

Esta característica la hace atractiva para la utilización en la industria de alimentos, porque resistiría tratamientos térmicos.

❖ **Clase III:** proteínas termolábiles de peso molecular mayor 30000 Da. Ej. helveticina J. La última revisión de la clasificación las divide en dos categorías principales: los lantibióticos que contienen lantioninas (clase I) y las bacteriocinas que no contiene lantionina (clase II), mientras que la clase general; proteínas termolábiles (es la clase III de bacteriocinas) constituyen un grupo llamado bacteriolisinas (Vásquez *et. al.* 2012).

3.4. Clasificación de las bacterias Gram negativas

Estas son unicelulares pueden ser inmóviles o bien móviles mediante flagelos. Además, otras pueden formar células de diferente forma y tamaño (por ejem., *Arthrobacter*). Se pueden mover mediante flagelos, en diferente número y morfología y otros se mueven mediante natación provocada por grupos de fibrillas axiales estrechamente enroscadas a la célula bacilar y encerradas por la propia pared celular y otra forma de moverse es por deslizamiento (Marín Galvin 2003).

3.4.1. Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre. Se han descrito 40 géneros con más de 150 especies. Estos géneros se han clasificado según sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica e hibridación y secuenciación de los ácidos nucleicos. A pesar de la complejidad de esta

familia, menos de 20 especies son las responsables de más del 95% de las infecciones. El género *Escherichia* se compone de cinco especies, de las que *Escherichia coli*, el microorganismo más prevalente de esta familia, es una de las bacterias prototípicas sometidas a estudio (Puerta García y Mateos Rodríguez 2010).

3.4.2. Acromobacterias

Son aerobias, saprófitas, actividad enzimática limitada. Parte esencial de la microflora psicrófila que prolifera en la leche conservada a bajas temperaturas. Producen sustancias viscosas o coloreadas (Rodríguez y Echevarría 2009)

Según Rodríguez y Echevarría (2009) se distinguen los siguientes géneros:

- ***Alcaligenes***: como indica su nombre prefiere medios de pH básico. *A. viscolactis* produce viscosidad en la leche y *A. metalcaligenes* produce un crecimiento mucoso en la superficie del requesón. Estos microorganismos proceden del estiércol, piensos, suelo, agua y polvo.

- ***Flavobacterium***: Las especies de este género producen pigmentos de color variable del amarillo al naranja, pueden producir coloraciones anormales. Algunas especies son psicrótrofas.

3.4.3. Micobacterias

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos de tres a cinco μm de longitud o curvos en forma de masa, inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos

citoplasmáticos, que poseen una resistencia mayor a la tinción por los colorantes comunes, pero una vez teñido son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido. Desde el punto de vista de los requerimientos atmosféricos algunos son aerobios y otros microaerófilos. En cuanto a la velocidad de crecimiento algunas especies son de crecimiento rápido y otros lentos. Se destaca en su estructura una gran riqueza en lípidos (20-60%). Las mycobacterias son agentes de enfermedades infecciosas que han acompañado al hombre a lo largo de su historia (Rodríguez s.f.).

3.5. Microorganismos presentes en los alimentos

Inicialmente, existe una gran variedad de microorganismos en la superficie de los alimentos naturales y, en ocasiones, en su interior. La composición cualitativa y cuantitativa es determinada por numerosos factores. Excepto en productos que han recibido diversos tratamientos antimicrobianos severos (pasteurización) o alimentos que por su naturaleza no suelen ser contaminados. Algunos microorganismos presentes en los alimentos sobreviven, otros se multiplican y otros se inactivan (Fernández citado por Ramírez Cuenca 2005).

La importancia de los microorganismos en los alimentos es más evidente. La producción de alimentos por técnicas microbiológicas es una actividad de larga historia: los microorganismos alteran los constituyentes de los alimentos de forma que los estabilizan permitiendo su mayor duración y, además, proporcionan compuestos que confieren sabores característicos a los alimentos por ellos producidos. Esta faceta se complementa con la acción de microorganismos alterantes de los alimentos y responsables de su deterioro de forma que se hagan inaceptables por los consumidores (UNI 2010).

Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuado. Es importante tener en cuenta que a temperaturas muy bajas, el metabolismo celular es muy bajo y las células paran de crecer; aunque no tienen por qué comenzar a morir. Sin embargo, cuando la temperatura es superior a la óptima, se produce la muerte celular rápidamente y las células

no pueden recuperar su capacidad de división si posteriormente baja la temperatura (Domínguez y Oliver 2007).

La mayoría de los microorganismos que producen enfermedades alimentarias, se desarrollan mejor a temperaturas cercanas a 37°C que es la temperatura normal del cuerpo humano. Pueden crecer entre los 5°C y 63°C a una velocidad considerable; fuera de este rango su crecimiento es más lento y su potencia reproductora se ve disminuida (OMS 2007).

3.5.1. Microorganismos patógenos.

Los patógenos transmitidos por los alimentos pueden afectar seriamente a cualquier persona, pero para las mujeres embarazadas y sus bebés, algunos patógenos pueden ser especialmente nocivos, incluso fatales (FDA 2013).

Según FDA (2013) los patógenos principales transmitidos por los alimentos son los siguientes; *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* (*E. coli*) patogénica, *Listeria monocytogenes*, *Norovirus* (virus del tipo Norwalk), *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Yersinia enterocolitica*.

A) *Escherichia coli*: es una de las especies predominantes entéricas en el intestino humano y, como parte de la flora intestinal normal, algunas de estas especies proporcionan muchos beneficios para la salud al huésped, por ejemplo, evitan la colonización del intestino por agentes patógenos dañinos. Sin embargo, hay pequeños grupos de *E. coli*, a veces se hace referencia como enterovirulent *E. coli*, diarreogénicas *E. coli*, o, más comúnmente, patógenas de *E. coli*, que pueden causar graves enfermedades diarreicas en los seres humanos (FDA 2012).

Según la FDA (2012) actualmente, hay seis grupos reconocidos patógenos: *E. coli enterotoxigénica* (ETEC), *E. coli enteropatógenas* (EPEC), *E. coli enterohemorrágica* (EHEC), *enteropatógenas de E. coli* (EIEC), *enteroagregativa E. coli* (CEEA), y *adherencia difusa E. coli* (DAEC). De estos, los cuatro primeros grupos son bien conocidos por ser transmitida a través de alimentos o agua contaminada; EHEC, sobre todo, a menudo implicados en los principales brotes de origen alimentario en todo el mundo.

E. coli O157:H7 posee capacidad para sobrevivir en condiciones ácidas (pH 2.5 a 3), crecer a muy bajas temperaturas (7 °C) y permanecer viables durante varios meses en productos congelados según cuadro dos. Esta tolerancia de *E. coli O157:H7* a valores bajos de pH puede explicar su baja dosis infectiva en el hombre, su persistencia en el tubo digestivo en los rumiantes, así como los alimentos con una acidez suficiente para inactivar a la mayoría de los microorganismos patógenos (Sánchez Rodríguez *et. al.* 2011).

Cuadro 2. Factores que afectan el crecimiento y la supervivencia de *Escherichia coli O157:H7*

Parámetro	Rango de crecimiento		
	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura	5-7 °C	37 °C	45 °C
Ph	2.5	7.0	9.0
Actividad de agua	0.95	----	----
% CLNa	----	----	6.5%
Velocidad de crecimiento (t_d) 25 horas/ generación, 8 °C			
Valor $D_{60} = 45$ segundos			

Fuente: Sánchez Rodríguez *et. al.* (2011).

B) El género *Salmonella*: pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos Gram negativos, de 0,7-1,5 x 2-5 µm, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, generalmente móviles por flagelos peritricos. Fermentan glucosa, maltosa y manitol, pero no fermentan lactosa ni sacarosa. Son generalmente catalasa positiva, oxidasa negativa y

reducen nitratos a nitritos. Son viables en diferentes condiciones ambientales, sobreviven a la refrigeración y congelación y mueren por calentamiento (mayor a los 70 °C). El serotipo de *Salmonella* está determinado por los siguientes tres tipos de antígenos: el antígeno somático (O), el antígeno flagelar (H) y el antígeno de virulencia (Vi) (ANMAT *et. al.* 2011 y FDA 2012).

IV. METODOLOGÍA

4.1. Descripción del lugar

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de microbiología de la Empacadora de carnes C&D, ubicada en el km 209 en la ciudad de Catacamas, carretera a Juticalpa, departamento de Olancho. Ciudad situada a una altura de 1450 pies sobre el nivel del mar, posee un clima agradable y fresco, con dos estaciones bien marcadas; un invierno y una estación de verano.

4.2. Materiales y equipo

Para la realización del experimento se utilizó los siguientes materiales y equipos:

4.2.1. Microorganismos

✓ Como cepas de bacterias ácido lácticas se utilizaron *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus fermentum* proporcionadas por Univet de San Pedro Sula y que fueron crió conservadas con glicerol (-20 °C) ej. Anexo 9

✓ Cepas de bacterias patógenas; *E. coli O157H:7* ATCC 23982 proporcionado por Univet de San Pedro Sula, esta cepa patógena fue crió conservada con glicerol (-20 °C) ej. anexo 9.

4.2.2. Cultivos de crecimiento

- ✓ Los cultivos de crecimiento que se utilizaron; caldo de triptona de soya (TSB), caldo Man, Rogosa, Sharpe (MRS), enriquecido con glucosa y agar eosina azul de metileno (E.M.B.).

- ✓ Para el control del pH en la fermentación se utilizó hidróxido de sodio (NaOH).

- ✓ Para el lavado y separación de la célula de las bacterias ácido lácticas se utilizó cloruro de sodio (NaCl).

4.2.3. Equipo

Se utilizaron incubadoras, plancha de agitación y calentamiento fisher scientific 7 x 7, magnetos, cabina de bioseguridad clase II tipo A2 labculture esco, micropipetas de 1 ml, puntas estériles, pipetas de vidrio, mecheros, centrifuga refrigerada heraeus multifuge x3r marca thermo scientific, erlenmeyer de 1000 ml, refrigerador, autoclave esterilizador eléctrico horizontal con secado marca: halthem, balanza analítica explorer ohaus, balanza portatil serie cs marca ohaus, phmetro thermo scientific eutech, termómetro bimetalico tipo reloj waterproof.

4.2.4. Equipos de protección personal y parámetros de seguridad

Se utilizó equipo de protección individual (EPI) para reducir al mínimo el nivel de riesgo durante la manipulación de los materiales y equipo, esto para garantizar la no contaminación y la seguridad personal. Para cumplir estas normas de seguridad se hizo uso de los siguientes equipos de protección: Gabacha blanca de laboratorio, guantes de nitrilo,

mascarilla y cámara de bioseguridad clase 2 A2. El laboratorio de microbiología es de bioseguridad clase 2 A2.

4.3. Manejo del experimento

El procedimiento siguiente se utilizó para evaluar la acción antimicrobiana de cada bacteria ácido láctico (*Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei*) contra *E. coli* O157H:7, de forma individual.

4.3.1. Preparación de los medios de crecimiento

- Caldo Triptona de soya (TSB); se diluyó con agua destilada hasta homogenizar uniformemente la sustancia, luego para la esterilización del medio se sometió a 121° C durante 15 minutos en autoclave.

- Caldo Man, Rogosa, Sharpe (MRS); se diluyó con agua destilada hasta homogenizar uniformemente la sustancia, luego para la esterilización del medio se sometió a 121° C durante 15 minutos en autoclave.

- Agar eosina azul de metileno (EMB); se diluyó con agua destilada, se agitó en calentamiento hasta ebullición, luego para la esterilización del medio se sometió a 121° C durante 15 minutos en autoclave.

4.3.2. Preparación de patógenos para la actividad antimicrobiana

Luego de la reconstitución de las cepas (Anexo 2) tanto de las BAL como patógeno se realizó lo siguiente:

- *E. coli* O157 H:7: A partir del cultivo puro se realizó repique por triplicado en caldo TSB, se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 37 °C.
- Preparación de las bacterias ácido láctica para la actividad antimicrobiana.

Las bacterias ácido lácticas utilizadas se hizo un repique un día antes de la fermentación, con caldo MRS y se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 37° C, así como se muestra en la figura 3.



Figura 3. Incubación de bacterias ácido lácticas

4.3.3. Proceso de fermentación

La bacteria ácido láctica se hizo crecer bajo el proceso de fermentación en sustrato comercial MRS. Se realizó una fermentación en discontinuo por cinco horas utilizando dos

Erlenmeyer de 1000 ml, sin aireación, en agitación continua con magneto fijado en 33 °C y una agitación de 100 rpm como se muestra en la figura cuatro. En la fermentación se utilizó un inóculo inicial de 10 % con respecto al sustrato de fermentación y se ajustó a un pH de 5.5-6.2 utilizando NaOH.

Cada 30 minutos se tomó una muestra de cada uno de los Erlenmeyer para medir el pH y se ajustó con NaOH, en caso necesario.



Figura 4. Proceso de fermentación de las BAL

a) Obtención y separación de células de bacterias ácido lácticas

En el proceso de fermentación cada hora se tomaron 10 ml del fermentado en tubos de ensayo. El fermentado se llevó a centrifugación durante 15 minutos/4° C a 3000 rpm. Transcurrido el tiempo de centrifugación, se separaron el precipitado y el sobrenadante. El precipitado, correspondiente a células de bacterias ácido láctica se sometió a un proceso de lavado con solución de NaCl al 0,9%, se agito suavemente, se centrifugo, por 15 min/4° C a 3000 rpm y se desechó el sobrenadante. De esta forma se obtuvo la célula de la bacterias ácido láctica libres de metabolitos (Serna Cock *et. al.* 2012). El mismo procedimiento se realizó a las horas cero, uno, dos, tres, cuatro y cinco de fermentación.

4.3.4. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* y sus metabolitos contra *E. coli* O157 H: 7.

La actividad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* y sus metabolitos contra *E. coli* O157 H:7, se midió a través de la técnica de difusión en placa. Para el crecimiento de *E. coli* O157 H:7, se utilizaron placas de agar EMB y nutritivo respectivamente de 5 mm de espesor (Anexo 10). En las placas en las cuales se midió la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum*, y *Lactobacillus casei* se realizaron orificios utilizando un sacabocado estéril de 15 mm de diámetro. Cada placa se sembraron por separado con 100 µl de cultivos de *E. coli* O157 H:7 (Serna Cock *et. al.* 2012)

Posteriormente, en forma aséptica, se tomaron 100 µl del inóculo de la fermentación de la bacteria ácido láctica, seguidamente se depositó en los orificios que se realizaron en las placas con agar eosina-azul de metileno la cual contenían el patógeno (Serna Cock *et. al.* 2012).

Finalmente, todas las cajas de Petri se incubaron a 37 °C por 24 horas.

4.4. Diseño experimental

Para evaluar la capacidad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei* contra *E. coli* O157 H:7 se utilizó un diseño factorial 4 X 6.

4.4.1. Los factores y niveles

✓ Factor sustancia biológica antimicrobiana (producto de fermentacion) con dos niveles por cada bacteria ácido láctica; célula de *Lactobacillus fermentum* + Metabolitos,

célula de *Lactobacillus fermentum* (Anexo 11), célula de *Lactobacillus casei* + metabolitos y célula de *Lactobacillus casei*.

✓ Factor tiempo de fermentación de las bacteria ácido láctica (*Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei*) con seis niveles; hora cero, uno, dos, tres, cuatro y cinco. La hora cero se tomó como las condiciones iniciales de la fermentación, las combinaciones entre los niveles de cada factor se muestra en la figura 5.

✓ Se realizaron 24 tratamientos según figura cinco con cuatro repeticiones por tratamiento, para un total de 96 observaciones.

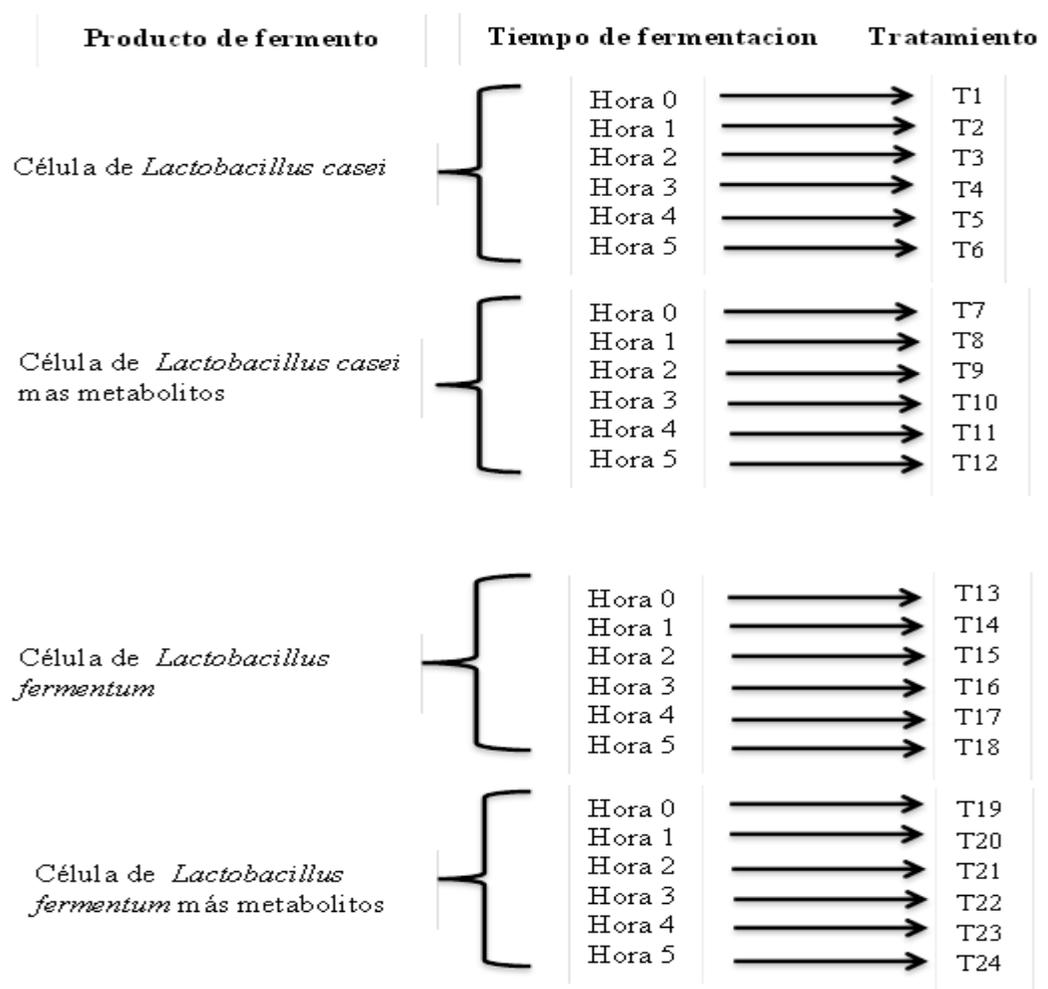


Figura 5. Diseño experimental del trabajo de estudio.

4.5. Variables a evaluar

4.5.1. Diámetro de inhibición

Transcurrido el tiempo de incubación, en las placas de Petri se midió el diámetro de los halos de inhibición (ej. anexo 12) de crecimiento de cada una de las bacterias ácido láctica (*Lactobacillus fermentum* y *Lactbacillus casei*) contra el *E. coli O157H:7*, utilizando regla milimétrica.

4.6. Análisis estadístico

Los resultados se interpretaron mediante el análisis de varianza (ANAVA) aplicando la prueba Tukey a los factores que resultaron ser estadísticamente significativos sobre la variable respuesta con una probabilidad de $p < 0,05$, esta para realizar la comparación entre promedios entre los niveles de cada factor. Los datos obtenidos del diseño experimental se analizaron mediante el programa estadístico Infostat.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo investigativo se realizó en las fechas comprendidas entre el 5 de agosto al 21 de septiembre. Se realizaron pruebas preliminares para disminuir el error. La actividad antimicrobiana “in vitro” de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei* frente a *E. coli* O157H:7 se desarrolló por la técnica de difusión en placas Petri en condiciones que favorecieron el crecimiento de los microorganismos.

5.1. Cambios de pH durante proceso de fermentaciones de las BAL (*Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei*)

5.1.1. Control de pH durante el proceso de fermentación de *Lactobacillus fermentum*

En la figura 6, se presenta el comportamiento de pH durante el proceso de fermentación de *Lactobacillus fermentum*. El pH inicial (hora cero) de la fermentación del inóculo fue de un promedio de 6.28, por lo cual se muestra que cada 30 minutos tenía un descenso el pH del inóculo que contenían los Erlenmeyer. La variación del pH en el tiempo 0 - 0.5 horas, tuvo un intervalo de 6.28-5.58 en promedio del inicial, a partir de la hora 0.5 las variaciones de pH del inóculo fueron descendiendo, siendo esta la hora (0 a 0.5) que se obtuvo el mayor descenso de pH esto posiblemente por las condiciones iniciales de la fermentación que se desarrolló el experimento. Estas variaciones de pH que se produjeron en el proceso de fermentación de *Lactobacillus fermentum* se desarrolló durante cinco horas (Anexo 3), teniendo una variación de pH promedio de 0.15 unidades entre cada 30 minutos de

fermentación. Para Calderón Santoyo *et. al.* (2003) *L. fermentum* es particularmente ácido tolerante, y bien adaptadas a las condiciones ácidas que se desarrollan durante la fermentación natural de pastas de cereales.

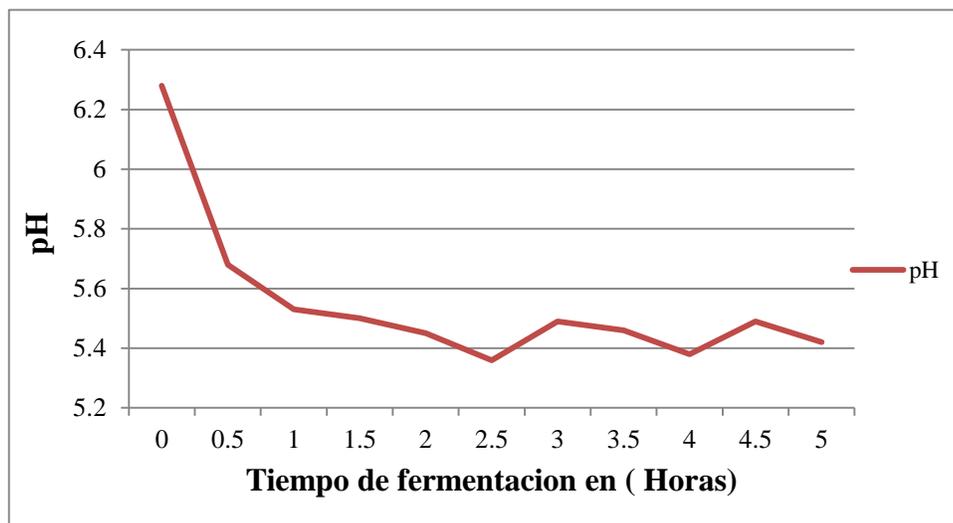


Figura 6. Comportamiento de pH durante proceso de fermentación de *Lactobacillus fermentum*

5.1.2. Control de pH durante el proceso de fermentación de *Lactobacillus casei*

De forma similar a lo anterior, en la figura 7, se muestra el comportamiento de pH en el proceso de fermentación de *Lactobacillus casei* durante cinco horas, teniendo variaciones de pH entre cada 30 minutos (0.5 hora). En este proceso es igual que en la fermentación de *Lactobacillus fermentum* se monitoreo el pH del inóculo cada 30 minutos (0.5 horas), en el anexo 4 se muestran los datos obtenidos del comportamiento del pH en la fermentación del inóculo de *Lactobacillus casei*.

El pH inicial (hora cero) de la fermentación inóculo fue de 6.46 de promedio, teniendo descensos de pH entre cada intervalo de hora. En la hora que se obtuvo un mayor descenso fue en el intervalo de 0 – 0.5 hora, con un intervalo de pH de 6.46 - 5.69, coincidiendo con

los resultados de Montero Lagunes *et. al.* (2009) que menciona que en el primer intervalo de tiempo se obtuvo el mayor descenso de pH con un intervalo de 5.70 – 4.25 en la fermentación de suero de leche con *Lactobacillus casei*

Pero comúnmente cada 30 minutos (0.5 hora) se obtuvieron descensos de pH, con intervalos de pH menores en comparación con el resultado que se obtuvo del intervalo de hora 0 – 0.5. Estos descensos pH se debe a lo que menciona Pérez *et. al.* (2011) que a medida que aumenta la fermentación de los carbohidratos del medio, el pH disminuye. En investigaciones de Armenta *et. al.* (2002) indica que la disminución más rápida de pH se llevó a cabo empleando la cepa de *Lactobacillus sp.*, aislada de residuos de camarón que se observó una disminución a pH cercano a 4.0 a las 48 horas de fermentación. La eficiencia en la acidificación del sustrato por esta cepa se explica por el hecho de que fue aislada de camarón tropical, por lo que era un microorganismo ya adaptado al medio.

Para Hofvendahla y Hahn–Hägerdal (2000) los parámetros que afectan a la fermentativa de ácido láctico (LA) de producción son: microorganismo, de carbono y nitrógeno de origen, el modo de fermentación, el pH, y temperatura.

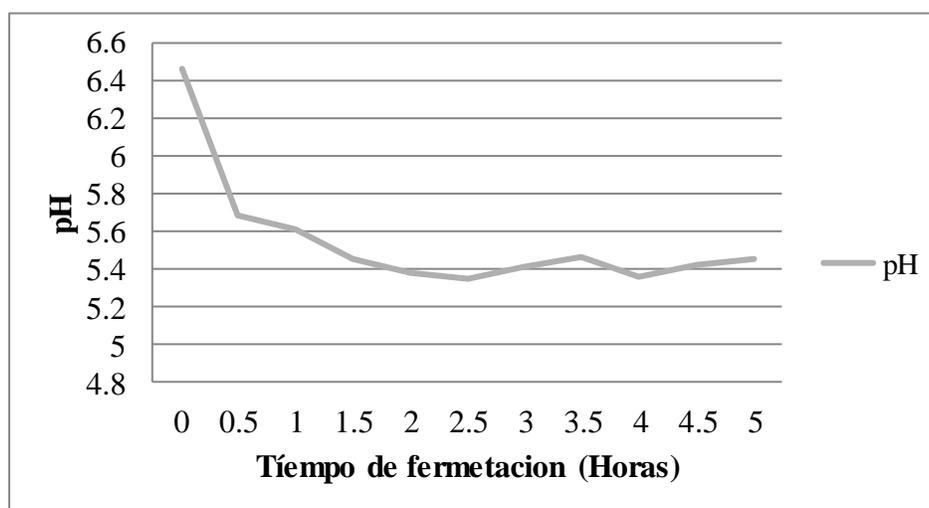


Figura 7. Comportamiento de pH durante proceso de fermentación de *Lactobacillus casei*.

5.2. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los factores de estudio (tipos de fermento y horas de fermentación) para las variables (Diámetro de halo de inhibición) se detallan a continuación mediante análisis estadísticos de: ANAVA y la prueba de Tukey para la comparación de medias de los factores significativos.

5.2.1. Determinación de la acción antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei* y sus metabolitos contra a *E. coli O157H:7*

En este trabajo experimental, según el análisis de varianza ANAVA (Anexo 5) se muestra que los factores de estudio hora de fermentación y tipo de fermento se ajustan al modelo con un $R^2 = 0.82$; es decir que en un 82% de los factores de estudio explican la variable el diámetro de inhibición que presentaron las BAL (*Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei*) y sus metabolitos en contra de *E. coli O157H:7* y un 18% se explica por otros factores que no fueron tomados en cuenta para la realización de este trabajo experimental.

La variable diámetro de inhibición presentó un coeficiente de variación de 4.36 lo que significa que los datos obtenidos están poco dispersos y con estos resultados nos permite la confiabilidad en la toma de los datos para la variable respuesta. Esto justifica que el método utilizado para medir el diámetro de inhibición fue uno de los mejores, ya sea porque el experimento se realizó con un equipo especializado.

Con los resultados obtenidos del trabajo experimental el análisis de varianza nos permite explicar si existe efectos significativos estadísticos de los factores de estudio sobre la variable respuesta, como se muestra en el anexo 5, se encontró que el tipo de fermento tiene efectos significativos ($p < 0,05$) sobre el halo de inhibición, es decir; *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* y sus metabolitos, su capacidad antimicrobiana contra *E.*

E. coli O157H:7 es significativa. Mientras que otro de los factores de estudio como lo fue el tiempo de fermentación con seis niveles (horas cero, uno, dos, tres, cuatro y cinco), este se presentó que tiene influencia sobre el halo de inhibición. Es decir el tiempo de fermentación tuvo efecto significativo ($p < 0,05$), sobre la inhibición de *E. coli* O157H:7.

La interacción entre los factores de estudio (Tipo de fermento * Tiempo de fermentación) según el análisis de varianza como se muestra en el anexo cinco son estadísticamente presentan significancia para p-valor ($P < 0,05$), lo que significa que la interacción tiene efecto sobre la variable respuesta y que los factores tomados en cuenta actúan de forma dependiente sobre la variable el halo de inhibición, es decir, actúan de forma que los dos factores necesitan de las condiciones que tienen entre ellos.

5.2.2. Efecto del tiempo de fermentación *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei* sobre *E. coli* O157:H7

Gráficamente se presenta el comportamiento de los tiempos de fermentación (hora cero, uno, dos, tres, cuatro y cinco) sobre los halos de inhibición de *E. coli* O157H:7, en la figura ocho, se observa que a la hora de fermentación cero se presentó la menor actividad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei* contra *E. coli* O157H:7 con un halo de inhibición de 1.63 cm, y que en el anexo 6 nos muestra la comparación de medias según Tukey y que la hora de fermentación cero es estadísticamente diferente p-valor ($P < 0,05$), a las horas de fermentación uno, dos, tres, cuatro y cinco. Sin embargo las horas de fermentación uno, dos, tres y cuatro son estadísticamente iguales es decir que a estas horas de fermentación se obtuvieron efectos estadísticos similares entre ellas sobre la variable respuesta, con halos de inhibición de 1.74, 1.73, 1.73 y 1.77 en cm.

Pero las horas de fermentación cuatro y cinco son estadísticamente iguales, presentando halos de inhibición con medias de 1.77 y 1.83 en cm. Donde matemáticamente se

recomendaría fermentar el inóculo de las BAL hasta la hora cinco, debido que aunque sea estadísticamente igual a la hora cuatro de fermentación, esta presenta la media más alta con halo de inhibición de 1.83 cm.

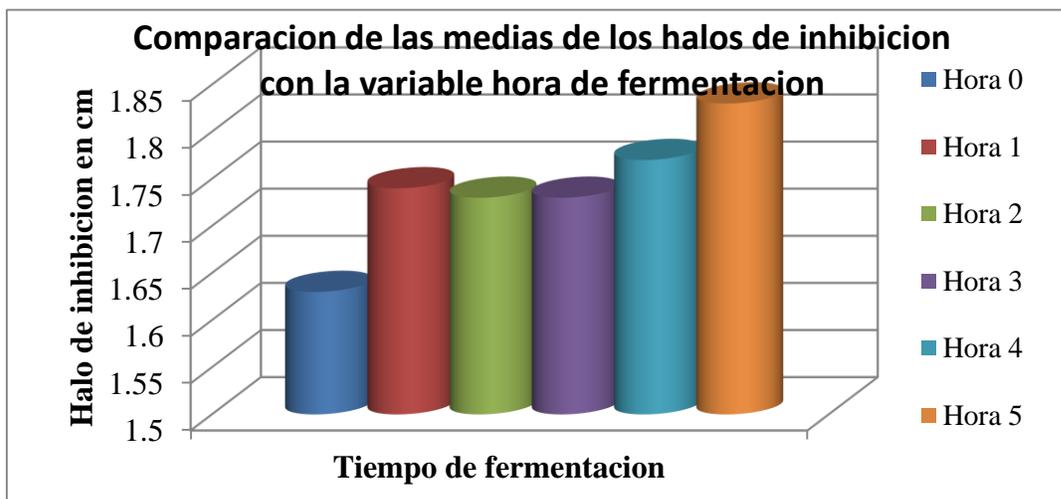


Figura 8. Comparación de las medias de los halos de inhibición de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei* contra *E. coli O157H:7* en el variable tiempo de fermentación.

5.2.3. Efecto de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei* y sus metabolitos sobre *E. coli O157H:7*

En la figura 9, muestra la actividad antimicrobiana de los tipos de fermentos (célula de *Lact. casei*, célula de *Lact. casei* + metabolito, célula de *Lact. fermentum* y célula de *Lact. fermentum* + metabolito) que se utilizaron para la inhibición de *E. coli O157H:7*, mostrando que el fermento con menor actividad antimicrobiana es la célula de *Lactobacillus casei* con una media 1.63 cm que fue el diámetro del halo de inhibición contra *E. coli O157H:7*, y mostrando diferencias estadísticas p-valor ($P < 0.05$) entre los demás tipo de fermentos estudiados. Mientras los fermentos; célula de *Lactobacillus casei*

+ metabolito y la célula de *Lactobacillus fermentum* mostraron que no existen diferencias estadísticas entre ellos con halos de inhibición de 1.69 y 1.71 cm, pero si existe diferencias estadísticas ($P < 0.05$), con los demás tipo de fermentos.

La célula de *Lactobacillus fermentum* + metabolito, tuvo actividad antimicrobiana sobre *E. coli* O157H:7 con un halo de inhibición de 1.91 cm, presentando diferencia estadística ($P < 0.05$) con los demás tipos de fermento (Anexo 7), y siendo este fermento el que muestra la mayor actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157H:7.

Gutiérrez Ramírez y Acosta Otálvaro (2009) demostró que *L. casei* produce sustancias antimicrobianas contra bacterias gram negativa como *E. coli* pudiendo utilizarse probablemente como un bioconservante natural en alimentos.

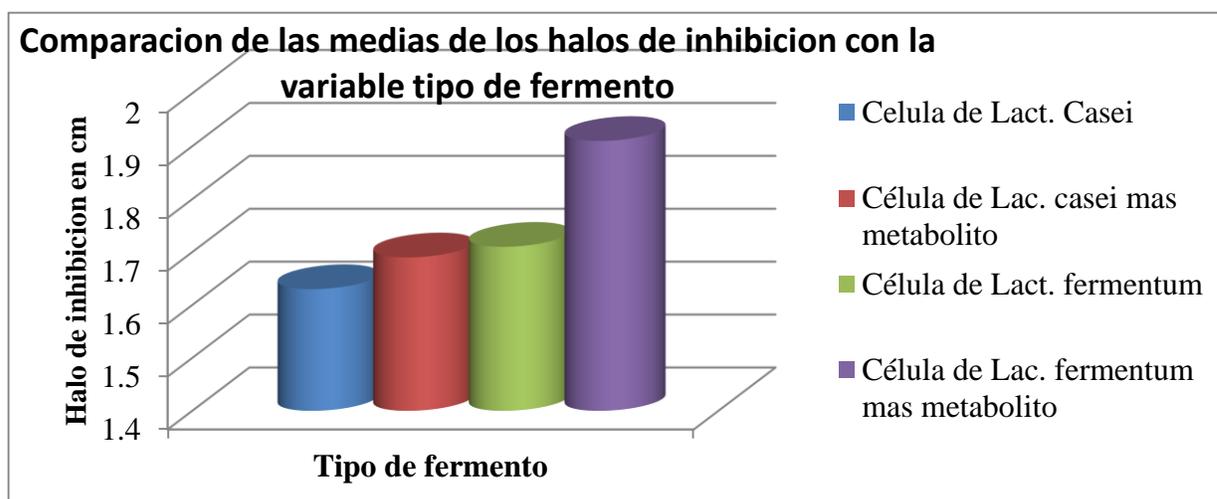


Figura 9. Comparación de las medias de los halos de inhibición de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei* contra *E. coli* O157H:7 en la variable tipo de fermento.

En el anexo 8, se muestran las comparaciones de las medias entre las interacciones (Tipo de fermento * Tiempo de fermentación), siendo un total de 24 tratamientos, es decir 24 interacciones, mostrando diferencias estadísticas ($P < 0.05$) pero con actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157H:7, la interacción célula de *Lact. casei* * hora cero no

presento actividad antimicrobiana contra *E. coli O157H:7* y sin posibilidades de utilizarlo como tratamiento conservador de alimentos, aunque en investigaciones de Gutiérrez Ramírez y Acosta Otálvaro (2008) encontraron que *L.casei* presentó actividad antagónica contra *E.coli*, pues la zonas de inhibición leídas como variable de respuesta fueron mayores de 2 cm. Mientras el tratamiento que presento la mayor actividad antimicrobiana frente a *E. coli O157H:7* en este estudio fue la hora cinco * célula de *Lact. fermentum* + metabolito con un halo de inhibición de 2.10 cm, estadísticamente diferente ($P < 0.05$) a los demás tratamientos, y según la prueba de comparación de medias de Tukey este tratamiento tiene mayor capacidad antimicrobiana contra *E. coli O157H:7* porque fue la media más alta.

Diferentes investigaciones han demostrado capacidad antimicrobiana de BAL y de bacteriocinas contra *E. coli* y otros patógenos Gram negativos (Garneau *et. al.* 2002; Mufandaedza *et. al.* 2006; Belfiore *et. al.* 2007 y Castro *et. al.* 2011). Por lo cual, el uso de las BAL y de sus productos metabólicos se considera generalmente como seguro. La aplicación de los compuestos antimicrobianos producidos como una barrera natural contra los agentes patógenos y deterioro de los alimentos causadas por agentes bacterianos se ha demostrado ser eficaz. Las bacteriocinas pueden ser aplicados en una forma purificada o en una forma cruda o mediante el uso de un producto fermentado previamente con una cepa productora de bacteriocina como un ingrediente en la elaboración de alimentos o incorporados a través de una cepa productora de bacteriocina (Ammor *et. al.* 2006; Zacharofa y Lovitt 2012). Pero según Rodríguez *et. al.* (2005) el efecto de las BAL productoras de bacteriocinas en los niveles más bajos de patógenos sería presumiblemente más inhibitoras.

En este trabajo, los metabolitos producidos en la fermentación por *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei*, se utilizaron de forma combinada con las células de estas BAL en la actividad antimicrobiana contra *E. coli O157H:7*, donde los resultados con mayor actividad antimicrobiana fueron la célula de las BAL más los metabolitos, estos resultados coinciden con la investigación de Serna Cock *et. al.* (2012) que demostró que *Weissella confusa* tuvo

mayor actividad antimicrobiana contra *E. coli* utilizando *Weissella confusa* más sus metabolitos.

En estudios de Cizeikiene *et. al.* (2013) ponen de relieve la posibilidad de que la seguridad alimentaria y calidad de los alimentos drásticamente se pueden mejorar mediante bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana. Porque según Helander *et. al.* (1997) y Ghanbari *et. al.* (2013) las bacterias ácido lácticas producen una variedad de compuestos de bajo peso molecular que incluyen ácidos, alcoholes, dióxido de carbono, diacetilo, peróxido de hidrógeno y otros metabolitos.

VI. CONCLUSIONES

Se demostró que *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* y sus metabolitos presentaron actividad antimicrobiana contra *E. coli O157H:7* patógeno gram negativo pero con perfiles diferentes de inhibición y garantizando que pueden ser utilizadas en la inocuidad, seguridad alimentaria para la prevención de las enfermedades transmitidas por los alimentos.

Se obtuvo la mayor actividad antimicrobiana contra *E. coli O157H:7*, con el producto de fermentación de la célula de *Lactobacillus fermentum* más sus metabolitos, siendo esta estadísticamente diferente p-valor ($P < 0.05$) a los demás productos de fermentación.

Se demostró que el tiempo de fermentación de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei* más sus metabolitos a la hora cinco tiene mayor actividad antimicrobiana contra *E. coli O157H:7*.

La célula *Lactobacillus casei* sin sus metabolitos y a la hora cero de fermentación no presentó actividad antimicrobiana contra *E. coli O157H:7*, por lo tanto este producto de la fermentación, no garantiza ser un agente conservador de alimentos.

VII. RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores en esta área sería importante modificar los factores de estudio como por ejemplo en el tiempo de fermentación se debería utilizar tiempos más largos para conocer si existe mayor actividad antimicrobiana.

Determinar las concentraciones de las bacterias ácido lácticas con que son capaces de inhibir una determinada concentración de *E. coli O157H:7* por medio de diluciones.

Probar la capacidad antimicrobiana de los metabolitos por si solos de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei* contra *E. coli O157H:7*

Evaluar la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei* contra otras cepas patógenas para así aprovechar su acción antimicrobiana y emplearlos como conservante de alimentos.

Comparar la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei* con otras bacterias ácido lácticas en contra de patógenos presentes en los alimentos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Academia del área de plantas piloto de alimentos. 2004. Introducción a la tecnología de alimentos; fermentaciones lácticas (en línea). 2 ed. s.l. Editorial LIMUSA S.A. de C.V. Consultado 22 mar. 2013. Disponible en <http://books.google.hn/books>

Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y tecnología médica (ANMAT), Ministerio de salud, Red Nacional de Laboratorios oficiales de análisis de alimentos (ReNaLOA). 2011. Análisis microbiológico de los alimentos (en línea). s.l. s.n.t. Consultado 7 mayo 2013. Disponible en http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf

Alarcón, P. 2011. Diagnostico microbiológico del genero *Streptococcus* (en línea). S.l. s.n.t. Consultado 02 may. 2013. Disponible en http://www.sochinf.cl/sitio/templates/sochinf2008/documentos/presentaciones_microbiologia_cli_2011/9_sr_Alarcon.pdf

Ammor, S; Tauveron, G; Dufour, E; Chevallier, I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds (en línea). Food control. Lempdes, FRA. 17(6):454-461. Consultado 04/11/13. Disponible en <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0956713505000551>

Armenta, RE; Guerrero Legarreta, I; Huerta, S. 2002. Extracción de caroproteínas a partir de residuos de camarón fermentados (en línea). Revista mexicana de ingeniería química. 1:49-55. Consultado 27/10/13. Disponible en <http://rmiq.org/NEW%20page/Pdfs/Vol.%201,%20No.%201-2/7.pdf>

Aznar, R; Zúñiga M. s.f. Que son las bacterias lácticas: bacterias lácticas. (en línea). Valencia, ES. s.e. Consultado 2 abr. 2013. Disponible en <http://redbal.iata.csic.es/documentos/sabiasque/Que%20son%20las%20bacterias%20lacticas.pdf>

Belfiore, C; Castellano, P; Vignolo, G. 2007. Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators (en línea). Food microbiology. Tucumán, ARG. 24(3):223-229. Consultado 04/11/13. Disponible en <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0740002006001262>

Bylund, M.G. s.f. Manual de industrias lácteas; Microorganismos (en línea). Madrid, ESP. s. n. t. Consultado 17 may. 2013. Disponible en <http://books.google.hn/books>

Calderón Santoyo, M; Loiseau, G; Rodríguez Sanoja, R; Guyot, JP. 2003. Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 reveals uncoupling between growth and α -amylase production at pH 4.0 (en línea). Institut de Recherche pour le Développement (IRD), FRA. Consultado 26/10/13. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816050200140X>

Castro, MP; Palavecino, NZ; Herman, C; Garro, OA; Campos, CA. 2011. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production (en línea). Meat science. Chaco, ARG. 84(4):321-329. Consultado 04/11/13. Disponible en <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0309174010003967>

Cizeikiene, D; Juodeikiene, G; Paskevicius, A; Bartkiene, E. 2013. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread (en línea). Kaunas University of Technology, LIT. Food control. 31(2): 539–545. Consultado 02/11/13. Disponible en <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0956713512006561>

Domínguez, LA; Oliver, CR. 2007. Manipulador de alimentos (en línea). 2 ed. Vigo, ESP. Editorial ideas propias. Consultado 2 Mayo 2013. Disponible en <http://books.google.hn/books?id=8CzrNjx0s78C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>

Faura, CA; Arosemena Angulo, EL; Calvo Torres, MA; Masdeu, LM; Martin Esteban, MA; Ordoñez, G. s.f. La *Salmonella* de actualidad desde siempre (en línea). s.l. s.n.t. Consultado 06 junio 2013. Disponible en books.google.hn/books?isbn=8492097876

FDA (Food and drug Administration). 2013. Profesionales de la medicina (en línea). s.l. consultada 03 May. 2013. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/HealthEducators/ucm091976.htm>

FDA (Food and Drug Administration). 2012. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins (en línea). 2 ed. s.l. s.n.t. Consultado 05 junio 2013. Disponible en www.fda.gov/.../CommitteesMeetingMaterials/Drugs/AntiviralDrugsAdvisoryCommittee/UCM283286.pdf

Forbes; Sahn; Weissfeld. 2009. Diagnostico microbiológico (en línea). 12 ed. Madrid, ESP. Editorial medica panamericana. Consultado 11/11/13. Disponible en books.google.hn/books?isbn=9500682435

García G; Quintero R; López M. comps. 2004. Biotecnología alimentaria; ácidos orgánicos (en línea). D.F, MEX. Editorial LIMUSA, S.A. DE C.V. Consultado 27 mar. 2013. Disponible en <http://books.google.hn/books>

García Martos, P; Fernández Del Barrio, M.T; Paredes Salido, F. 1994. Microbiología clínica practica (en línea). 2da ed. Universidad de Cadiz, ESP. Consultado 18/10/13. Disponible en http://books.google.hn/books?id=4N8qVKckrUUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

García, V. s.f. Introducción a la microbiología (en línea). 2 ed. Universidad de Puerto Rico, PR. Editorial Universidad estatal a distancia. Consultado 16 nov. 13. Disponible en books.google.hn/books?isbn=9968313580

Garneau, S; Martin, NI; Vederas, JC. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria (en línea). *Biochimie. Alberta, CAN.* 84(5):577-599. Consultado 04/11/13. Disponible en <http://www.sciencedirect.com> ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0300908402014141

Ghanbari, M; Jami, M; Domig, KJ; Kneifel, W. 2013. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria (en línea). *LWT - Food science and technology.* Viena, AUT. 54(2):315-324. Consultado 04/11/13. Disponible en <http://www.sciencedirect.com>. ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S002364381300203X

Hernández Chavarría, F. 2002. Fundamentos de epidemiología: El agente (en línea). San José, CR. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Consultado 01 abr. 2013. Disponible en <http://books.google.hn/books>

Hofvendahla, K; Hahn-Hägerdal, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources (en línea). *Enzyme and Microbial Technology.* (26): 87-107. Consultado 30/10/13. Disponible en <http://www.sciencedirect.com> [/science/article/pii/S0141022999001556](http://science/article/pii/S0141022999001556)

La ciencia y sus demonios. 2011. Viernes procariota: *Lactobacillus bulgaricus* (en línea). s.l. Consultada 26 abr. 2013. Disponible en <http://lacienciaysusdemonios.com> [/2011/05/06/viernes-procariota-lactobacillus-bulgaricus/](http://2011/05/06/viernes-procariota-lactobacillus-bulgaricus/)

Lagarriga, JM. s.f. Productos lácteos Tecnología: Bacterias lácticas (en línea). s.l. Edicions UPC. Consultado 15 mar. 2013. Disponible en <http://books.google.hn/books>

Marín Galvin, R. 2003. Físicoquímica y microbiología de los medios acuáticos (en línea). Madrid, ESP. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Consultado 11 nov. 13. Disponible en <https://www.google.hn/search?hl=es&tbo=p&tbm=bks&q=isbn:847978590X>

Martínez Pajares, JD; Díaz Morales, O; Acosta González, F; Ramos Díaz, JC. 2012. Sepsis por *Leuconostoc spp.* en un lactante sano (en línea). Archivos argentinos de pediatría 110(2). Consultado 21 abr. 2013. Disponible en http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S032500752012000200018&script=sci_arttex

Monroy Dosta, Ma del C; Castro Barrera, T; Fernández Perrino, FJ; Mayorga Reyes, L. 2009. Bacteriocinas producidas por bacterias prebióticas (en línea). s.l. s.n.t. Consultado 04 jun 2013. Disponible en www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n73ne/bacterio.pdf

Montero Lagunes, M; Juárez Lagunes, FI; García-Galindo, HS. 2009. Suero de leche fermentado con *Lactobacillus* para la alimentación de becerros en el trópico (en línea). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, MEX. Consultado 16 nov. 2013. Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952009000600004&script=sci_arttext

Mora Peñaflo, N; García Guerrero, A. 2007. Tesis. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (en línea). Hidalgo, MEX. Consultada 15/10/13. Disponible en www.uaeh.edu.mx/docencia/tesis/icbi/licenciatura/documentos/Susceptibilidad%20de%20bacterias%20acido%20lacticas.pdf

Mufandaedza, J; Viljoen, BC; Feresu, SB; Gadaga, TH. 2006. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains (en línea). International journal of food microbiology. Chinhoyi, ZWE. 108(1):147-152. Consultado 04/11/13. Disponible en <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S>

Negrón, M. 2009. Microbiología estomatológica (en línea). 2 ed. Buenos Aires, ARG. Editorial médica panamericana, S.A. consultado 27/10/13. Disponible en <http://books.google.es/books?id=GxmuivjZBgC&printsec=frontcover&dq=Microbiología+Estomatológica>.

OMS (Organización Mundial de la Salud). 2007. Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de alimentos (en línea). FRA. Consultado 25 nov. 2013. Disponible en www.who.int/foodsafety/publications/consumer/manual_keys_es.pdf

Pares, R; Juárez A. 2002. Bioquímica de los microorganismos; Características generales de las bacterias del ácido láctico (en línea). Barcelona, ESP. Editorial reverté. S.A. Consultado 09 mar. 2013. Disponible en books.google.hn/books?isbn=8429174540

Pascual Anderson, M^a del Rosario. 2005. Enfermedades de origen alimentario: Microorganismos. Ediciones Díaz de Santos, S.A. ESP. 177 p.

Pérez, M; Laurencio, M; Rondón, AJ; Milian, G; Bocourt, R; Arteaga, F. 2011. Actividad antimicrobiana de una mezcla probiótica de exclusión competitiva y su estabilidad en el tiempo (en línea). Rev Salud Anim. 33(3): 147-153. Consultado 27/10/13. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v33n3/rsa02311.pdf>

Puerta García, A y Mateos Rodríguez, F. 2010. Enterobacterias (en línea). Hospitalario Universitario de Albacete, ESP. Consultado 11 nov. 13. Disponible en http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf

Ramírez Cuenca, M. del S. 2005. Tesis. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (en línea). s.l. Consultada 26/03/13. Disponible en <http://dgsa.uaeh.edu.mx.pdf>

Rodríguez, E; Calzada, J; Arques, JL; Rodríguez, JM; Nuñez, M; Medina, M. 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli O157:H7* in cheese (en línea). International Dairy Journal. Madrid, ESP. 15(1):51-57. Consultado 03/11/13. Disponible en <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0958694604001220#bBIB4>

Rodríguez, G. s.f. Mycobacterias (en línea). s.l. s.n.t. Consultado 11 nov. 13. Disponible en <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/micobacterias.pdf>

Rodríguez Gómez, JM. 2006. Microorganismos y salud: Mejora de las propiedades tecnológicas y sensoriales de *Lactobacillus casei* por ingeniería de rutas metabólicas. Madrid, ESP. Editorial complutense S.A. 222 p.

Rodríguez, R; Echevarría, M. 2009. Microbiología de la leche (en línea). Ed. de la Universidad Tecnológica Nacional, ESP. Consultado 18/10/13. Disponible en www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_micrb_09/microbiologia_leche.pdf

Rosales Urbano, V; Acosta Quicaño, J; Santos Erazo,D; Gonzáles, AJ. 2009. *Micrococcus* (en línea). Universidad privada telesup, PER. Consultado 10/11/13. Disponible en <http://es.scribd.com/doc/23675883/Trabajo-Final-Micrococcussss>

Sánchez Rodríguez, JA; Serrano Jiménez, S; Navarro, RM; Jodral Villarejo, ML. 2011. Patógenos emergentes en la línea de sacrificio porcino. Madrid, ESP. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Consultado 03 mayo 2013. Disponible en <http://books.google.hn/books>

Serna Cock, L; Rubiano Duque, LF; Loaiza Castillo, NB; Enríquez Valencia, CE. 2012. *Weissella confusa* como un agente bioprotector en la inocuidad alimentaria contra patógenos Gram negativos (en línea). Valle del Cauca, COL. Consultado 16/5/13. Disponible en <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/download/142/136>

Stanier R, Ingraham J; Wheelis M; Painter P. 1992. Microbiología: Bacterias de ácido láctico. 2 ed. New jersey, Englewood cliffs. REVERTE, S.A. 753 p.

UNI (Universidad Nacional de Ingeniería). 2010. Curso microbiología de los alimentos (en línea). Estelí, NIC. S.n.t. consultado 26 mayo 2013. Disponible en avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf

Vargas Cortes, MA; Hernández Martínez, M; López Ramírez, E. Comps. 2006. XVI Verano de la investigación científica (en línea). s.l. Consultada 26 abr. 2013. Disponible en books.google.hn/books?isbn=9689024108

Vásquez, SM; Suarez, H; Zapata, S. 2012. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne (en línea). s.l. s.n.t. Consultado el 2 may. 2013. Disponible en http://www.alimentariaonline.com/media/MLC048_anti.pdf

Vásquez M, SM; Suarez M, H; Zapata B, S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne (en línea). Scielo. Medellín, COL. Consultado 17 may. 2013. Disponible en http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071775182009000100007&script=sci_arttext

Yakult. S.f. Qué utilidad tienen las BAL. s.l. s.n.t. Consultado 17 may. 2013. Disponible en http://www.yakult.com.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=312&Itemid=86

Zacharofa, MP; Lovitt, RW. 2012. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a Review Article (en línea). Swansea University, SWE. APCBEE Procedía. 2:50-56. Consultado 02/11/13. Disponible en <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S2212670812000814>

ANEXOS

Anexo 1. Bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas

HOMOFERMENTATIVAS	HETEROFERMENTATIVAS	HETEROFERMENTATIVAS FACULTATIVAS
<i>Lactobacillus:</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii subesp. bulgaricus.</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. jensenii</i> <i>Lb. delbrueckii subesp. lactis</i> <i>Lb. farciminis</i> <i>Lb. salivarius subesp salivarius</i> <i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. gallinarium</i>	<i>Lactobacillus:</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. hilgardii</i> <i>Lb. sanfrancisco</i> <i>Lb. trichodes</i> <i>Lb. fructivorans</i> <i>Lb. collinoides</i> <i>Lb. kéfir</i> <i>Lb. Maleferementans</i>	<i>Lb. acetotolerans</i> <i>Lb. hamsteri</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. coryniformis</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sake</i> <i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. pentosus</i> <i>Lb. alimentarius</i> <i>Lb. agilis</i>
<i>Pediococcus:</i> <i>P. damnosus</i> <i>P. dextranicum</i> <i>P. parvulus</i>	<i>Leuconostoc:</i> <i>Lc. amelibiosum</i> <i>Lc. argentinum</i> <i>Lc. lactis</i> <i>Lc. mesenteroides</i> <i>Lc. Gelidum</i>	<i>Pediococcus:</i> <i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>P. damnosus</i> <i>P. dextranicus</i> <i>P. inopinatus</i>
<i>Streptococcus:</i> <i>S. bovis</i> <i>S. thermophiles</i>	<i>Carnobacterium:</i> <i>C. divergens</i> <i>C. mobile</i> <i>C. gallinarum</i> <i>C. piscícola</i>	
<i>Lactococcus:</i> <i>L. lactis subesp. Lactis</i> <i>L. lactis subesp. Cremoris</i>	<i>Weissella:</i> <i>W. confusus</i> <i>W. paramesenteroides</i>	

<i>L. lactis subesp. Hordmiae</i>	<i>W. confusus</i>	
<i>L. garviae</i>	<i>W. halotolerans</i>	
<i>L. plantarum</i>	<i>W. minor</i>	
	<i>W. viridescens</i>	
<i>Vagococcus:</i>		
<i>V. fluvialis</i>		
<i>V. salmoninarum</i>		

Fuente (Stiles y Holzalpfel, citado por Ramírez Cuenca 2005).

Anexo 2. Procedimiento para la reconstitución de cultivos liofilizados.

1. Preparativos

Contar con recipientes para desechar los fragmentos de vidrio, agua esteril, pipetas pasteur estériles y pinzas metálicas.

2. Calentamiento de la punta a la llama.

- ❖ Dependiendo de la intensidad de la combustión puede requerir entre 5 y 15 segundos.
- ❖ Asegúrese que el cono de calor solo afecte la punta estrecha de la ampolla para no dañar el liófilo o la cepa microbiana.
- ❖ El tapón interior de algodón no debe oscurecerse.

3. Resquebrajado del vidrio con agua estéril.

- ❖ Dejar caer de 1-4 gotas (gota a gota, no a chorro).
- ❖ Si no se produce ningún agrietamiento repita el paso anterior alargando un poco el tiempo de calentamiento.
- ❖ Si en el momento del resquebrajamiento el algodón se dispara hacia adentro es señal que el calentamiento ha sido excesivo. Además de que será más difícil su extracción se habrá corrido el riesgo de perjudicar la viabilidad del liófilo.

4. Retirada de los fragmentos de vidrio.

- ❖ Si no se hubieran desprendido en el momento de desquebrajarse se pueden retirar con la ayuda de unas pinzas flameadas previamente dando un golpe seco.
- ❖ Suba con las pinzas el algodón para facilitar su manipulación posterior.

- ❖ Todas estas operaciones deben hacerse con la debida atención que precisa el manejo del vidrio roto (p. ej. Proteja sus ojos, no retire fragmentos con los dedos, etc.).

5. Resuspension del liófilo y siembra.

a) Re suspensión

Con la ayuda una pipeta Pasteur añada 0.2 – 0.3 ml del medio líquido estéril recomendado. Resuspenda cuidadosamente el liófilo hasta conseguir una rehidratación completa. Puede ayudarse de la pipeta para aspirar y expulsar la suspensión pero hágalo suavemente y evitando la formación de burbujas de aire.

b) Siembra

Utilice toda la suspensión para inocular un medio solido (placa Petri con agar) y un tubo con 0.5 -10 ml con medio líquido que deberá ser incubado hasta observar crecimiento antes de escalar a volúmenes mayores.

No es aconsejable guardar parte de la suspensión en la propia ampolla como reserva pues una vez abierta no constituye un recipiente idóneo para este fin.

c) Incubación

A la temperatura óptima para el microorganismo y siguiendo cualquier otra indicación que exista en el albarán de entrega o en la ficha de la cepa.

Anexo 3. Cambios de pH durante proceso de fermentación de *Lactobacillus fermentum*

Hora de fermentación	pH	N° de Erlenmeyer de 1000 ml	NaOH
0	6.27	1	
	6.29	2	
0.5	5.72	1	
	5.65	2	
1	5.58	1	
	5.48	2	Se le agrego 8.33 ml
1.5	5.53	1	
	5.47	2	Se le agrego 8.33 ml
2	5.45	1	Se le agrego 8.33 ml
	5.44	2	Se le agrego 8.33 ml
2.5	5.36	1	Se le agrego 8.5 ml
	5.36	2	Se le agrego 8.5 ml
3	5.36	1	Se le agrego 8.5 ml
	5.45	2	Se le agrego 8.33 ml
3.5	5.40	1	Se le agrego 8.33 ml
	5.52	2	
4	5.40	1	Se le agrego 8.33 ml
	5.35	2	Se le agrego 8.5 ml
4.5	5.52	1	
	5.46	2	Se le agrego 8.33 ml
5	5.41	1	
	5.43	2	

Anexo 4. Cambios de pH durante proceso de fermentación de *Lactobacillus casei*.

Hora de fermentación	pH	N° de Erlenmeyer de 1000 ml	NaOH
0	6.46	1	
	6.45	2	
0.5	5.69	1	
	5.68	2	
1	5.58	1	
	5.63	2	
1.5	5.45	1	Se le agrego 8.33ml
	5.46	2	Se le agrego 8.33 ml
2	5.45	1	Se le agrego 8.33 ml
	5.50	2	
2.5	5.48	1	Se le agrego 8.33 ml
	5.22	2	Se le agrego 9 ml
3	5.36	1	Se le agrego 8.5 ml
	5.45	2	Se le agrego 8.33 ml
3.5	5.40	1	Se le agrego 8.33 ml
	5.52	2	
4	5.38	1	Se le agrego 8.5 ml
	5.35	2	Se le agrego 8.5 ml
4.5	5.44		Se le agrego 8.33 ml
	5.40		Se le agrego 8.33 ml
5	5.47		
	5.42		

Anexo 5. Análisis de varianza (ANAVA) del trabajo experimental

Variable	N			R²	C.V.
Diámetro de inhibición	96			0.82	4.36
FV	SC	GL	CM	F	p-valor
Modelo	1.89	23	0.08	14.34	<0.0001
Tiempo de fermentación	0.36	5	0.07	13.63	<0.0001
Tipo de fermento	1.07	3	0.36	62.03	<0.0001
Tiempo de fermentación*Tipo de fermento	0.46	15	0.03	5.38	<0.0001
Error	0.41	72	0.01		
Total	2.30	95			

Anexo 6. Prueba de comparación de medias según Tukey para la variable Tiempo de fermentación

Tiempo de fermentación	N	Medias	Agrupación	
0 Hora	16	1.63 cm	A	
3 Hora	16	1.73 cm	B	
2 Hora	16	1.73 cm	B	
1 Hora	16	1.74 cm	B	
4 Hora	16	1.77 cm	B	C
5 Hora	16	1.83 cm	C	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Anexo 7. Prueba de comparación de medias según Tukey para la variable Tipo de fermento.

Tipo de fermento	N	Medias	Agrupación	
Célula de <i>Lac. Casei</i>	24	1.63 cm	A	
Célula de <i>Lac. casei</i> mas metabolito	24	1.69 cm	B	
Célula de <i>Lact. fermentum</i>	24	1.71 cm	B	
Célula de <i>Lac. fermentum</i> mas metabolito	24	1.91 cm	C	

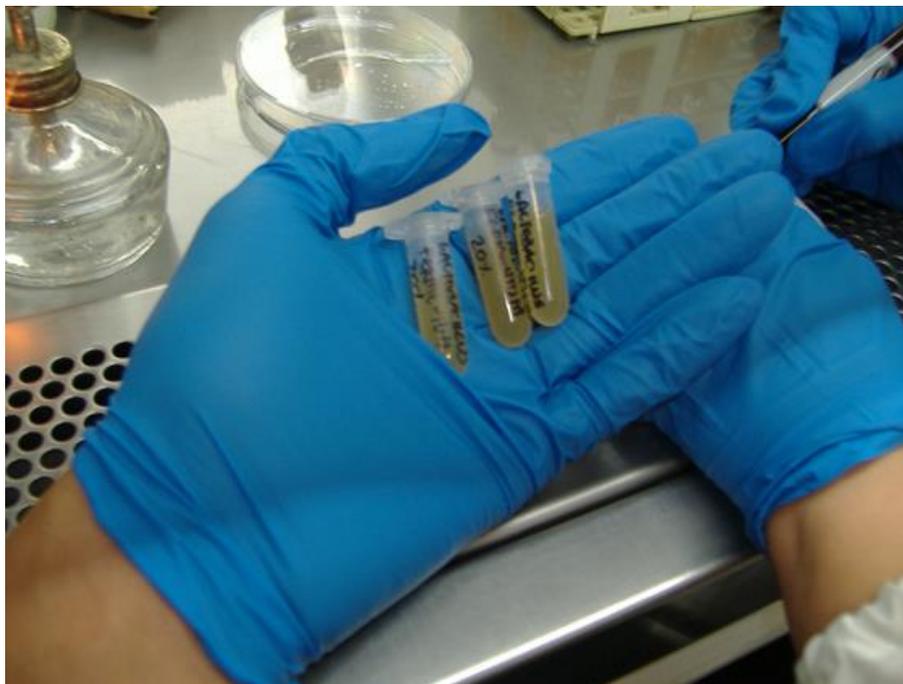
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Anexo 8. Prueba de comparación de medias según Tukey para la variable interacción Tipo de fermento * Hora de fermento

Tiempo de fermentación (Horas)	Tipo de fermento	N	Medias	Agrupación
0	Célula de <i>Lac. Casei</i>	4	1.50 cm	A
0	Célula de <i>Lac. casei</i> mas metabolito	4	1.55 cm	AB
1	Célula de <i>Lac. Casei</i>	4	1.60 cm	ABC
1	Célula de <i>Lac. casei</i> mas metabolito	4	1.63 cm	ABCD
2	Célula de <i>Lac. Casei</i>	4	1.63 cm	ABCD
0	Célula de <i>Lac. Fermentum</i>	4	1.63 cm	ABCD
4	Célula de <i>Lac. Fermentum</i>	4	1.65 cm	ABCD
3	Célula de <i>Lac. Casei</i>	4	1.65 cm	ABCD
3	Célula de <i>Lac. casei</i> mas metabolito	4	1.68 cm	ABCD
1	Célula de <i>Lac. Fermentum</i>	4	1.68 cm	ABCD
4	Célula de <i>Lac. Casei</i>	4	1.70 cm	ABCD
5	Célula de <i>Lac. Fermentum</i>	4	1.70 cm	ABCD
5	Célula de <i>Lac. Casei</i>	4	1.73 cm	BCD
2	Célula de <i>Lac. casei</i> mas metabolito	4	1.73 cm	BCD
2	Célula de <i>Lac. fermentum</i> mas metabolito	4	1.78 cm	CDE
3	Célula de <i>Lac. fermentum</i> mas metabolito	4	1.78 cm	CDE
4	Célula de <i>Lac. casei</i> mas metabolito	4	1.78 cm	CDE
3	Célula de <i>Lac. Fermentum</i>	4	1.80 cm	CDE
2	Célula de <i>Lac. Fermentum</i>	4	1.80 cm	CDE
5	Célula de <i>Lac. casei</i> mas metabolito	4	1.80 cm	CDE
0	Célula de <i>Lac. fermentum</i> mas metabolito	4	1.83 cm	DE
4	Célula de <i>Lac. fermentum</i> mas metabolito	4	1.95 cm	EF
1	Célula de <i>Lac. fermentum</i> mas metabolito	4	2.05 cm	F
5	Célula de <i>Lac. fermentum</i> mas metabolito	4	2.10 cm	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Anexo 9. Crioconservacion de cepas con glicerol al 20%



Anexo 10. Crecimiento de *E. coli* O157H:7 en placas Petri con agar EMB



Anexo 11. Célula de *Lactobacillus fermentum*



Anexo 12. Actividad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* contra *E. coli* O157H:7

