

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

TESIS:

ECOEFICIENCIA DEL APROVECHAMIENTO DEL LACTOSUERO PARA LA OBTENCIÓN DE *Lactobacillus* DE ACCIÓN BACTERICIDA

Para optar el Grado Académico de

DOCTOR EN CIENCIAS

MENCIÓN: GESTIÓN AMBIENTAL Y RECURSOS NATURALES

Presentada por:

Mg. Sc. RODOLFO RAÚL OREJUELA CHIRINOS

Asesor:

Dr. AUGUSTO HUGO MOSQUEIRA ESTRAYER

Cajamarca, Perú

2023

COPYRIGHT © 2023 by
RODOLFO RAÚL OREJUELA CHIRINOS
Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

TESIS APROBADA: ECOEficiencia DEL APROVECHAMIENTO DEL LACTOSUERO PARA LA OBTENCIÓN DE *Lactobacillus* DE ACCIÓN BACTERICIDA

Para optar el Grado Académico de

DOCTOR EN CIENCIAS

MENCIÓN: GESTIÓN AMBIENTAL Y RECURSOS NATURALES

Presentada por:

Mg. Sc. RODOLFO RAÚL OREJUELA CHIRINOS

JURADO EVALUADOR

Dr. Augusto Hugo Mosqueira Estraver
Asesor

Dr. Edin Edgardo Alva Plasencia
Jurado Evaluador

Dr. Jorge Bernardo Gamarra Ortiz
Jurado Evaluador

Dr. José Antonio Niño Ramos
Jurado Evaluador

Cajamarca, Perú

2023



Universidad Nacional de Cajamarca
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 080-2018-SUNEDU/CD
Escuela de Posgrado
CAJAMARCA - PERU



PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

MENCIÓN: GESTIÓN AMBIENTAL Y RECURSOS NATURALES

Siendo las 12:25 horas del día 08 de marzo del año dos mil veintitrés, reunidos en el Auditorio de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por el **Dr. EDIN EDGARDO ALVA PLASENCIA**, **Dr. JORGE BERNARDO GAMARRA ORTIZ**, **Dr. JOSÉ ANTONIO NIÑO RAMOS** y en calidad de Asesor, el **Dr. AUGUSTO HUGO MOSQUEIRA ESTRAYER**; Actuando de conformidad con el Reglamento Interno de la Escuela de Posgrado y el Reglamento del Programa de Doctorado de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se inició la SUSTENTACIÓN de la tesis titulada: **ECOEficiencia DEL APROVECHAMIENTO DEL LACTOSUERO PARA LA OBTENCIÓN DE *Lactobacillus* DE ACCIÓN BACTERICIDA**; Presentada por el Maestro en Ciencias Mención en Ciencias Alimentarias **RODOLFO RAUL OREJUELA CHIRINOS**.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó A. P. O. B. P. con la calificación de DIECISIETE (17) la mencionada Tesis; en tal virtud, el Maestro en Ciencias Mención Ciencias Alimentarias, **RODOLFO RAUL OREJUELA CHIRINOS**, está apto para recibir en ceremonia especial el Diploma que lo acredita como **DOCTOR EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias, Mención: **GESTIÓN AMBIENTAL Y RECURSOS NATURALES**.

Siendo las 13:45 horas del mismo día, se dio por concluido el acto.


.....
Dr. Augusto Hugo Mosqueira Estrayer
Asesor


.....
Dr. Edín Edgardo Alva Plasencia
Presidente-Jurado Evaluador


.....
Dr. Jorge Bernardo Gamarra Ortiz
Jurado Evaluador


.....
Dr. Jose Antonio Niño Rams
Jurado Evaluador

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo lo dedico principalmente a Dios, por ser el inspirador y proveedor de fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados en mi formación profesional.

A mi amada esposa Amparito, a mis hijos Jossep y Mayra quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por bendecirme la vida y protegerme de esta pandemia, por guiarme a lo largo de mi existencia, por ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y debilidad.

Agradezco a los docentes de la Escuela de Post Grado de la Universidad Nacional de Cajamarca, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de mis estudios de Post Grado, de manera especial, al Dr. Carlos Manuel Rosales Loredo y al Dr. Augusto Hugo Mosqueira Estraver como Asesores de mi proyecto de investigación, quienes me han guiado con su paciencia, y su rectitud como docente, y a los empresarios de las Industrias Lácteas de la ciudad de Cajamarca por su valioso aporte a esta investigación.

A mis compañeros y amigos con los que compartí la formación académica Doctoral, a cada persona con la que alguna vez esterilicé o compartí una pipeta, hice, discutí o deliré sobre algún experimento en el laboratorio, a aquellos con los que expusimos una serie de trabajos, a la gente con la que trabajé en los proyectos de investigación y a quienes tuve la suerte de conocer en la Escuela de Post Grado como en el Departamento de Ciencias Biológicas de nuestra Universidad.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Bases teóricas	6
2.2.1. La leche	6
2.2.2. El lactosuero	7
2.2.3. Microbiota del lactosuero	8
2.2.4. Bacterias ácido lácticas.....	9
2.2.5. Las propiedades funcionales o probióticas de los <i>Lactobacillus</i> sp.....	11
2.2.6. Bacteriocinas.....	13
2.2.7. Definición de términos básicos.	14
CAPÍTULO III.	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1 UBICACIÓN.....	16
3.2. MATERIALES Y METODOS.	16
3.2.1. Muestras	16
3.2.2. Medios de cultivo para aislamiento e identificación bioquímica de <i>Lactobacillus</i> sp.....	16
3.2.3. Medios de cultivo para aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> sp y <i>E. coli</i> Enteropatógena.	17
3.3. MÉTODOS.	20

3.4. Aislamiento, pureza, viabilidad y conservación de las bacterias patógenas <i>Salmonella</i> sp. y <i>E. coli</i> Entero patógena, a partir del queso fresco.	31
3.4.4 Purificación de <i>E. coli</i>	37
3.4.5. Determinación de la actividad bactericida de los <i>Lactobacillus</i> sp. frente a los patógenos en estudio.....	38
3.4.5. a. Obtención de los metabolitos antibacterianos libre de células.....	39
3.4.5.b. Viabilización de los microorganismos patógenos <i>Salmonella</i> sp. y <i>E. coli</i> . Enteropatógena en concentraciones celulares de 10^4 y 10^6 ufc/ml, respectivamente.....	41
3.4.5.c. Enfrentamiento entre microorganismos (en diferentes concentraciones celulares).....	41
3.4.5.d. Enfrentamiento de los metabolitos (sobrenadante).....	42
CAPÍTULO IV	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
CAPÍTULO V.....	68
CONCLUSIONES	68
RECOMENDACIONES	69
VII.- BIBLIOGRAFIA.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Muestra de lactosuero dulce de leche bovina y queso fresco artesanal de las plantas lácteas semiindustriales de la ciudad de Cajamarca.	21
Tabla 2: Resultado obtenido en el recuento de unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> sp.	22
Tabla 3: Substratos incluidos en cada uno de los 50 micro recipientes de la galería enzimática para bacterias ácido-lácticas API 50 CH	31
Tabla 4: Comportamiento a la coloración Gram y pruebas fenotípicas de tipificación mediante pruebas bioquímicas de tipificación de los <i>Lactobacillus</i> aislados.	45
Tabla 5: Género <i>Lactobacillus</i> predominantes en las muestras. (Generadores de metabolitos de acción Bactericida contra los enteropatógenos en estudio).	46
Tabla 6: Sensibilidad microbiana. - enfrentamiento entre células.	49
Tabla 7: Sensibilidad microbiana. Enfrentamiento de los metabolitos de acción bactericida de los <i>lactobacillus</i> aislados frente a los patógenos aislados de los quesos frescos, <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> sp.	50
Tabla 8: Resumen Sensibilidad microbiana del enfrentamiento de los metabolitos antibacterianos y enfrentamiento entre células.	57
Tabla 9: Pruebas API 50EE de especies de <i>Lactobacillus</i> sp.	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de diluciones seriadas para contaje de <i>Lactobacillus</i> sp. viables en concentración de células de 10^6 y 10^8	23
Figura 2: Esquema general de pruebas morfológicas e identificación bioquímica por el Sistema API 50 CHL Bio Meriux.....	29
Figura 3: Hoja de interpretación de datos Api 50 CHL.	30
Figura 4: Esquema de diluciones seriadas. - para contaje de microorganismos viables de los enteropatógenos <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> sp.....	36
Figura 5: Porcentajes de <i>Lactobacillus</i> aislados en las muestras de lactosuero dulce de leche bovina.....	47
Figura 6: Concentraciones de <i>Lactobacillus</i> sp. aislados del lactosuero dulce de leche bovina	83
Figura 7: Coloración Gram. - <i>Lactobacillus</i> sp Gram.....	84
Figura 8: Enfrentamiento de los metabolitos (sobrenadante).....	85
Figura 9: <i>Salmonella</i> sp. aislada del queso fresco de leche bovina	85
Figura 10: <i>E. coli</i> Enteropatógena aislada del queso fresco de leche bovina.	86
Figura 11: Inhibición a las 12 horas de incubación del enfrentamiento entre lactobacilos asociados, aislados en suero de leche bovina con los patógenos <i>E. coli</i> enteropatógenos y <i>Salmonella</i> sp.....	87
Figura 12: Inhibición a las 24 horas de incubación	88
Figura 13: Actividad bactericida	89
Figura 14: Método de enfrentamiento entre células asociadas.....	90

Figura 15: Enfrentamiento entre la asociación de *E. coli* Enteropatógena a concentración celular de 10^6 y *Salmonella* sp. a concentración celular de 10^4 , frente a los *Lactobacillus* aislados a concentración celular de 10^6 UFC / mL..... 91

Figura 16: Enfrentamiento entre la asociación de *E. coli* Enteropatógena a concentración celular de 10^6 y *Salmonella* sp. a concentración celular de 10^4 , frente a los *Lactobacillus* aislados a concentración celular de 10^8 UFC / mL..... 92

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivos la ecoeficiencia del aprovechamiento del lactosuero dulce de leche bovina para obtener *Lactobacillus* de acción bactericida y evaluar su actividad bactericida in vitro frente a *Salmonella sp* y *Escherichia coli* Enteropatógena aislados del queso fresco de leche bovina, patógenos frecuentes en los quesos frescos. El lactosuero dulce de leche bovina suplementado con glucosa y vitamina B12, como fuente rica en nitrógeno y carbohidratos, es óptimo para el crecimiento de *Lactobacillus sp*. De este lactosuero se obtuvo 8 cepas de *Lactobacillus*: *Lactobacillus curvatus sp. curvatus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus*; estas cepas fueron asociadas en concentraciones celulares de 10^4 , 10^6 y 10^8 ufc /ml y enfrentadas a los patógenos E. coli Enteropatógena en concentración celular de 10^6 UFC/ml. y *Salmonella sp* en concentración celular de 10^4 UFC/ml, mediante las técnicas de enfrentamiento entre células y de los metabolitos libre de células por los métodos de difusión en agar en placa, demostrando efectos bactericidas contundentes, llegando a halos de inhibición mayores a 1 mm y 4 mm, dentro las 18 horas de incubación, luego a las 24 y 48 horas los efectos bactericidas se intensificaron observándose una eliminación extensa en forma de barrido de estos patógenos, así como, no se observó antagonismo entre estos *Lactobacillus*. El Eco aprovechamiento del efluente lactosuero de dulce leche bovina, da lugar a una economía circular, minimizando los impactos negativos que genera al ambiente.

Palabras clave: Obtención de *Lactobacillus sp*, efecto bactericida, lactosuero.

SUMMARY

The research had as objectives the eco-efficiency of the use of sweet bovine milk whey to obtain *Lactobacillus* with bactericidal action and to evaluate its in vitro bactericidal activity against *Salmonella* sp. and Enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh bovine milk cheese, frequent pathogens in fresh cheeses. Sweet bovine milk whey supplemented with glucose and vitamin B12, as a rich source of nitrogen and carbohydrates, is optimal for the growth of *Lactobacillus* sp. From this whey, 8 strains of *Lactobacillus* were obtained: *Lactobacillus curvatus* sp. *curvatus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus*; these strains were associated at cell concentrations of 10⁴, 10⁶ and 10⁸ ufc/ml and confronted with the pathogenic Enteropathogenic *E. coli* at a cell concentration of 10⁶ CFU/ml. and *Salmonella* sp. at a cellular concentration of 10⁴ CFU/ml, through the confrontation techniques between cells and the cell-free metabolites by the agar plate diffusion methods, demonstrating forceful bactericidal effects, reaching inhibition halos greater than 1 mm and 4 mm, within 18 hours of incubation, then at 24 and 48 hours the bactericidal effects intensified, observing an extensive sweeping elimination of these pathogens, as well as no antagonism between these *Lactobacillus*. The Eco-use of the whey effluent from sweet bovine milk gives rise to a circular economy, minimizing the negative impacts it generates on the environment.

Key words: Obtaining *Lactobacillus* sp, bactericidal effect, whey.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El suero de la leche es uno de los residuos más representativos de la industria lechera, por cada kilogramo de queso se producen aproximadamente nueve litros de efluente (85-90% del volumen de la leche), siendo el suero uno de los contaminantes más severos que existen a nivel ambiental (Cury et al., 2014). En Cajamarca, el lactosuero generado por la industria de la leche, actualmente constituye un problema ambiental, afectando la composición biológica, química y física del agua de los ríos y del suelo, debido a que muchas plantas semi industriales de lácteos de la ciudad de Cajamarca no cuentan con sistemas necesarios y apropiados de aprovechamiento y de tratamiento para el control biológico y químico de este efluente.

En tal sentido, un gran porcentaje de este residuo (lactosuero) se descarta de la forma más económica posible, como vertiéndose al drenaje o alcantarillado de la zona urbana de Cajamarca, o directamente a los ríos y suelos, como en el caso de las plantas artesanales ubicadas en las zonas rurales. Es bien conocido, - que este recurso (efluente lactosuero dulce de leche bovina), rico en nutrientes genera un problema ambiental, en el agua de los ríos y suelos desnaturalizando su composición química y biológica, como, por ejemplo, altera la demanda bioquímica de oxígeno de las aguas de los ríos, afectando la vida acuática de los ríos y de los suelos (Aider & Halleux, 2009). Este lactosuero como efluente resultante de la elaboración del queso, posee en su composición, componentes biológicos y químicos de gran potencial, los cuales pueden ser aprovechados en la industria alimentaria. Su gran valor nutricional rico en proteínas y vitaminas, lo constituye como una rica fuente de nutrientes

para obtener grandes masas de *Lactobacillus* sp autóctonos presentes en este lactosuero, los cuales son generadores de varios metabolitos antibacterianos que controlan o eliminan a patógenos indeseables en los quesos frescos, los que pueden constituirse como conservantes biológicos en la solución de los problemas de inocuidad de los quesos frescos, evitando enfermedades de origen alimentario a los consumidores, así como, dando lugar a su aprovechamiento sin riesgos biológicos, de fuentes proteicas muy necesarias para el desarrollo de nuestro organismo. Exiguas son las referencias de investigación referente al aprovechamiento de este efluente como recurso en la obtención de Bacterias Ácido Lácticas autóctonas con acciones bactericidas frente a patógenos alimentarios.

El queso fresco, producto alimenticio de gran valor nutricional obtenido de la leche bovina, tiene en la actualidad problemas serios de inocuidad por diversos factores técnicos y de higiene, como deficiencias en la infraestructura que van desde la obtención de la leche hasta su procesamiento, y el desconocimiento de los sistemas de calidad en la inocuidad de los alimentos, los cuales viene generando una serie de problemas en la salud de los consumidores, generando infecciones gastrointestinales de consideración especialmente en niños y en adultos mayores, siendo las bacterias patógenas *Salmonella sp.* y *Escherichia coli* Enteropatógena, como las más frecuentes, y a la vez, generan pérdidas económicas considerables por acciones de decomiso en los procesos de control de calidad de alimentos, por lo entes gubernamentales (Vásquez et al. 2018).

Por lo tanto, teniendo en consideración lo expresado anteriormente, el objetivo del desarrollo de la presente investigación se centra en la ecoeficiencia del aprovechamiento del lactosuero para la obtención de *Lactobacillus* de acción bactericida.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Pocos son los antecedentes de investigación en la obtención de grandes masas de Bacterias Ácido Lácticas autóctonas o propias del lactosuero dulce bovino de acción bactericida frente a patógenos alimentarios. Referente a la eficacia de la acción bactericida de los *Lactobacillus* sp. frente a microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* y otros Gram positivo +, así como, de *Escherichia coli* y otras Gram negativas, existe mucha información relevante proveniente de investigaciones recientes en otros países, donde mayormente estos microorganismos son obtenidos de otros sustratos y son aditivados en diferentes alimentos para asegurar su inocuidad y otras propiedades funcionales.

Trabajos realizados en países como España, México, Colombia, Chile, Brasil, se ha encontrado que aprovechan el lactosuero dulce bovino y otros tipos de lactosuero mayormente como sustrato o medio de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus* sp. obtenidos de otras fuentes, como son el yogurt, queso de doble crema, queso fresco, quesillo, vegetales fermentados (chucrut).

Así mismo, Anas et al. (2008), utilizaron la leche de cabra como sustrato para el aislamiento de ocho (8) cepas de *Lactobacillus*, en zonas del oeste de Argelia. Las cepas de *Lactobacillus* que aislaron fueron: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. *paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* sp. *lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paraplantarum* y *Lactobacillus sakei* sp. *sakei*. Así mismo, determinaron que las cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* sp. *paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus* mostraron una

mayor acción bactericida. Cabe mencionar que en este estudio utilizaron métodos microbiológicos y bioquímicos para identificar bacterias lácticas con actividad bactericida.

(Ramírez & Vélez, 2016) en su investigación titulada Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra, con el objetivo de aislar, caracterizar y seleccionar algunas cepas autóctonas provenientes de leche y queso de cabra, usando metodologías de siembra en medios enriquecidos selectivos, con técnicas de aislamiento y tipificación microbiológicas específicas, lograron obtener grandes masas de *Lactobacillus* sp autóctonos presentes en la leche y queso fresco artesanal de cabra con efecto bactericida, aislando 18 cepas de *Lactobacillus* (7 correspondieron a cepas de *Lactobacillus plantarum*, 2 cepas de *Lactobacillus acidophilus* 1 cepa de *Lactobacillus paracasei* sp., 4 cepas de *Lactococcus lactis* sp. y 4 cepas de *Leuconostoc mesenteroides* sp.) destacándose el *Lactobacillus paracasei* y el *Lactobacillus plantarum* como cepas de mayor efecto bactericida, por su capacidad de acidificación en el sustrato lácteo.

Acosta & Ramón (2013), en su trabajo de investigación denominado Evaluación del efecto antimicrobiano del *Lactobacillus casei* desarrollado en el suero dulce de leche bovina frente a *Listeria monocytogenes*, cuyo objetivo fue obtener un sobrenadante de los metabolitos antibacterianos generados por la cepa comercial *Lactobacillus casei*, Choozit RA 21 LYO 125 DCU —R211) los cuales fueron generados durante los procesos de la fermentación de suero dulce de leche bovina. Encontraron un buen crecimiento de esta bacteria y un buen efecto bactericida frente a *Listeria monocytogenes*, enfrentando los metabolitos antibacterianos obtenidos en concentraciones celulares de Log 10⁵ y 10⁷ ufc/ml de *Lactobacillus casei* frente a concentraciones Log 10⁴ ufc/ml de *L. monocytogenes* a temperaturas de 12°C y 35°C y a un pH de 6,5, sobresaliendo un mayor efecto bactericida a

temperaturas de 35 °C y a un pH de 6,5, debido a que en esta temperatura se observó un mayor crecimiento del *Lactobacillus casei* y por ende una mayor producción de metabolitos antibacterianos de actividad antimicrobiana.

Fuentes et al., (2017), en un trabajo de investigación denominado Capacidad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas autóctonas aisladas de queso doble crema y quesillo colombiano cuyo objetivo fue evaluar la capacidad antimicrobiana de los *Lactobacillus* aisladas y seleccionados de acuerdo a su capacidad bioquímica y tecnológica, frente a *Salmonella entérica* subsp. entérica serovar *Typhimurium* ATCC 13311 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Demostraron que de los metabolitos obtenidos de los 32 *Lactobacillus* aislados 18 no presentaron efecto bactericida, el restante que son 14 si presentaron capacidad bactericida. Estos sobrenadantes libres de células conteniendo los metabolitos bactericidas que presentaron efecto bactericida se usaron en concentraciones de Unidades de Actividad (UA) de 64,000 / ml de *Lactobacillus lactis subsp. lactis* y UA de 4,000 / ml de *Lactobacillus fermentum*. De los 14 que mostraron actividad bactericida frente a *Salmonella enterica* subsp. entérica serovar *Typhimurium* ATCC 13311 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644S el *Lactococcus lactis subsp. lactis* y (QDC23, QDC18) y *Lactobacillus fermentum* (QDC32) mostraron una mayor capacidad inhibidora, debido a su buena capacidad acidificante y proteolítica.

Castro et al., (2017), en su artículo científico titulado Bacterias Ácido lácticas: Mecanismos de Acción y Actividad antimicrobiana Contra Patógenos en Quesos, mencionan que los Bacterias Ácido Lácticas generan una serie de metabolitos antibacterianos, siendo una de ellas las bacteriocinas como péptidos de cadena corta de origen ribosomal, las cuales alteran la membrana celular de las bacterias, causando un proceso de apoptosis que es una vía de destrucción o muerte celular programada o provocada por las bacteriocinas alterando

el desarrollo y crecimiento de las bacterias patógenas, indicando además, que estas bacteriocinas son activas frente a diferentes patógenos y estables a diferentes pH y temperaturas, como también propone el uso de liposomas como vehiculizadores de estos péptidos antimicrobianos, como mecanismos de protección a altas temperaturas.

Estrada et al., (2005), en su trabajo de investigación denominado, Evaluación *in vitro* del Efecto Bactericida de Cepas Nativas de *Lactobacillus* sp. Contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* encontró que los metabolitos obtenidos de los *Lactobacillus plantarum sub esp. plantarum* y *Lactobacillus Lactobacillus brevis sub esp. brevis*, conseguidos de productos fermentados, presentaron acción bactericida contra estas bacterias en estudio y que estos metabolitos sostenidos a temperatura de 0 °C y 4 °C presentaron mejor actividad inhibitoria frente a *Salmonella* y *E. coli* en concentraciones celulares de $1,5 \times 10^{-12}$. Concluye que los extractos sintetizados obtenidos por centrifugación y enfrentados por el método de difusión en pozos, tienen un alto potencial bactericida contra estas dos patógenos comprometidos en las toxiinfecciones de origen alimentario.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. La leche

La leche es la secreción láctea limpia y fresca obtenida por el ordeño total de una o más vacas sanas propiamente alimentadas y cuidadas. En Centro América y Sur América las normas que se exigen para determinar si una leche es de buena calidad son las siguientes: debe ser una leche libre de calostro, preservantes, antibióticos, sabor y olores extraños; además, la leche será obtenida de vacas calificadas como sanas, es decir que no presenten enfermedades infecto contagiosas como tuberculosis, brucelosis y mastitis (Lechepuleva, 2022).

2.2.2. El lactosuero

El lactosuero es un subproducto líquido de color amarillo verdoso, obtenido después de la separación del coagulo en la fase micelar, durante la elaboración del queso. Este subproducto contiene valores considerables de proteínas globulares hidrosolubles, lactosa, vitaminas, minerales grasa, lo que lo caracteriza como una fuente rica en nutrientes y debido a estas características nutricionales se comporta como una de las principales fuentes de contaminación ambiental y por estas características importantes es de necesidad urgente reutilizar este efluente (Parra, 2010).

Existen dos tipos de lactosuero dependiendo de la coagulación inducida de la leche, ya sea por el uso de componentes químicos o de bacterias ácido lácticas y por acción enzimática como la quimosina proveniente del cuajo de animales domésticos, o de vegetales, como las higueras o de origen bacteriano (Jelen, 2003).

Debido a sus componentes de este lactosuero, se han obtenido una serie de componentes como etanol, ácidos orgánicos, bebidas no alcohólicas, bebidas fermentadas, biomasa, concentrados, aislados e hidrolizados de proteína, películas comestibles, medio de soporte para encapsular sustancias, producción de xantana, enzimas, separación de la lactosa para fines endulzantes en alimentos, entre otras aplicaciones como la generación de celulosa para la fabricación de envolturas (Parashar, et al., 2006).

Dentro de los microorganismos patógenos más frecuentemente asociados a la producción de quesos frescos están *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* Enteropatógena. responsables de brotes de ETA asociados al ordeño antihigiénico y al uso de leche no pasteurizada y procesos de producción poco higiénicos (Vásquez et al., 2018).

Salmonella sp. y *Escherichia coli* Enteropatógena son bacilos Gram negativos productores de salmonelosis y colibacilosis, respectivamente, son una de las principales causas de gastroenteritis en humanos y animales. Las infecciones por estas bacterias son una causa importante de morbilidad y mortalidad especialmente en niños y personas inmunocomprometidas (Miller et al., 2014).

En nuestro medio, los patógenos *Salmonella* sp. las *E. coli* generadoras de diarreas, tienen una alta prevalencia en niños. Así mismo, hay antecedentes de trabajos epidemiológicos en diferentes localidades nacionales, en donde identifican al queso fresco como vehiculizador de estas bacterias (Riveros y Ochoa, 2015).

2.2.3. Microbiota del lactosuero

***Los Lactobacillus* sp.**

Dentro de las bacterias Ácido lácticas, el grupo *Lactobacillus* es el más importante y existe una gama muy amplia de individuos, presentándose especies con propiedades bioquímicas y fisiológicas muy diferentes (Vásquez et al., 2009).

La diversidad en los microorganismos presentes en la leche y en el lactosuero, es la responsable de la gran diferencia en las características organolépticas entre los quesos hechos con leche bovina, y su presencia depende de los procesos térmicos empleados en su elaboración. El microbiota dominante incluye: Bacterias lácticas como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, etc, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y levaduras. Así como otros organismos presentes en la leche cruda producto de las malas prácticas de ordeño como son *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Salmonella* sp. *Escherichia coli* sp., *Citrobacter*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*,

Aeromonas, Arthrobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, Propionibacterium (Parra, 2010).

2.2.4. Bacterias ácido lácticas

Las Bacterias Ácido Lácticas “BAL” son microorganismos que tiene diversas aplicaciones, siendo una de las principales la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales para obtener diferentes productos entre estos se encuentra el queso. Estos microorganismos, además de contribuir en la bio preservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva. Además, son un grupo de microorganismos representativos por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, inmóviles, anaerobios, micro aerofílicos o aerotolerantes. Para su multiplicación requieren de sustratos con altos valores de actividad de agua y ricos en nutrientes, características que favorecen su proliferación. Precizando que estos medios de cultivo contengan fuentes ricas de nitrógeno, azúcares como la glucosa y lactosa y otros factores de crecimiento como minerales y vitaminas, como el fósforo y las vitaminas del complejo B12. La leche es el medio típico y satisfactorio para su proliferación, estos microorganismos son generalmente utilizados como cultivos indicadores en la elaboración y conservación de productos lácteos, tales como leche acidificada, yogurt, mantequilla, crema y quesos. La clasificación de las BAL en géneros diferentes se basa en el principio morfológico, por sus características bioquímicas que se clasifican en homo fermentativas por generar como producto final ácido láctico y en hetero fermentativas por producir etanol, acetato, CO₂, además del ácido láctico. Así mismo, por el modo fermentación de la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del

ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina. Se encuentran los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*. Sin embargo, los géneros más representativos son: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*. Las bacterias ácido lácticas como inhibidoras de microorganismos, tienen una gran importancia en el contexto de la industria alimenticia, ya que sobresale su importancia en la conservación y seguridad de alimentos. Y una de las características fisiológicas de estos microorganismos es su tolerancia al ácido, como consecuencia obligada de su metabolismo (Crowley, Mahony y Van Sinderen, 2013; Martínez Fernández, 1998).

Hernández et al., (2017), manifiestan que la Bacterias Ácido lácticas tienen capacidad de conservar los productos lácteos debido a que estos microorganismos producen péptidos de origen ribosomas denominados bacteriocinas que poseen efecto antimicrobiano, que actúan principalmente formando poros en la membrana celular de las bacterias, causándoles la apoptosis. Además, propone su uso en el control sanitario en la industria de la leche.

Se indica además que la mayor producción de bacteriocinas se da mayormente en medios complejos ricos en nitrógeno, carbono y fósforo (Rojas Muñoz, 2010). Así mismo, determinados factores de crecimiento, según naturaleza de la cepa productora de bacteriocinas, como son las condiciones de fermentación (temperatura, tiempo de desarrollo, pH de inicio y final entre 5,5 a 6,0, agitación condiciones micro aerobiosis, son factores a considerar en producción eficaz de las bacteriocinas (Yin et al., 2004).

Hoy en día, la industria alimenticia usa *Lactobacillus* adicionándolos en la producción de alimentos a base de leche, carne y otros, generando un alto grado del control de patógenos (Wee et al., 2003).

Dentro de los procesos metabólicos generados por las bacterias ácido lácticas esta la fermentación del ácido láctico, que es uno de los procesos más investigados tanto en la industria alimenticia como farmacéutica por la aplicación potencial de ácido láctico y biomasa de *Lactobacillus* para el control de patógenos alimentarios, así mismo, el uso de *Lactobacillus* sp. en la industria alimentaria cada día su uso es más frecuente para mejorar la inocuidad alimentaria, así como, algunas características organolépticas y funcionales nutraceuticas, tanto en la elaboración de alimentos fermentados y no fermentados (Rzepakowska et al., 2017; Alfano et al., 2015).

Para considerar un microorganismo como prebiótico generador de metabolitos antibacterianos, sustancias generalmente reconocidas como seguras, es necesario su caracterización de género, especie y cepa, lo cual garantizará que se trata de un microorganismo inocuo y seguro. Estas caracterizaciones permiten denominarlo como un organismo GRAS (Generally Regarded as Safe) según su estudio sobre sus efectos biológicos y clínicos (Amarocho, 2011).

2.2.5. Las propiedades funcionales o probióticas de los *Lactobacillus* sp.

Las propiedades prebióticas se determinaron según las siguientes características funcionales y metabólicas, como la resistencia a sales biliares y pH gástrico, por lo que, la viabilidad de los microorganismos es primordial en su trayecto hacia el intestino donde pueden adherirse a la mucosa intestinal y a las células epiteliales, para realizar sus efectos benéficos y en cantidades necesarias para minimizar la adhesión de la microbiota competitiva, que en muchos de los casos genera el desplazamiento de patógenos. A partir de estas características, se pueden evidenciar los beneficios de las propiedades funcionales de estas bacterias, ya que durante los procesos de fermentación se genera un incremento en la

disponibilidad de proteínas, péptidos y aminoácidos debido a su acción proteolítica. Así mismo, se ha demostrado, en modelos animales que los niveles de macrófagos, células natural-killer e interferón gamma se encuentran aumentados (Fooks, Fuller y Gibson, 1999).

Lo anterior indica que el conocimiento generado sobre el metabolismo y la genética de las bacterias ácido lácticas es útil para el desarrollo de nuevos alimentos con propiedades nutracéuticas (funcionalidad), así como, mejora su textura y extiende la vida útil del alimento, mediante el control de microorganismos indeseables.

La acción bactericida de los *Lactobacillus* sp. es debida a la generación de una serie de metabolitos como productos finales de la fermentación. Estas sustancias son ácidos como el láctico y el acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y productos secundarios generados por la acción de lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y tiocianato. El sistema lactoperoxidasa tiocianato (LP) comprende una serie de reacciones que se producen de forma natural en diversos fluidos orgánicos (saliva leche, leche, suero de leche, lágrimas, etc.). Se cree que su función es proteger al organismo frente a diversos microorganismos patógenos. Para que funcione el sistema se requiere la presencia de peroxidasas, tiocianato (SCN^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La enzima, en presencia de H_2O_2 , cataliza la oxidación de SCN^- originando diversos productos con actividad antimicrobiana, entre los cuales el hipotiocianito (OSCN^-) es el que se forma en mayores cantidades. Se considera que la actividad antimicrobiana de los compuestos formados radica en la oxidación de grupos sulfhídricos de diversas enzimas y otras proteínas microbianas, aunque también pueden oxidar el NADH y NADPH perturbando los sistemas de transporte de energía y aminoácidos o la actividad de las enzimas glicolíticas. La eficacia del sistema LP puede variar dependiendo de diversos agentes y factores, pero, en general, puede decirse que tiene una acción bacteriostática y/o bactericida sobre bacterias Gram negativas catalasa positiva. Las

bacterias Gram positivas son más resistentes, considerándose que sólo inhibe su crecimiento (Parra, 2010).

2.2.6. Bacteriocinas

La colicina fue la primera bacteriocina descubierta en el año 1925, generada por la bacteria *Escherichia coli* (Marcos Balciunas, et al., 2013). Son definidas como péptidos antimicrobianos de cadena corta, caracterizadas por tener componentes proteicos biológicamente activos de efecto bactericida (Delgado, 2008). Se ha comprobado que estos componentes proteicos, dependiendo de su grado de pureza, resisten a pH ácidos y a temperaturas de pasteurización.

Actualmente el campo de acción inhibitorio de las bacteriocinas se determina por dos pruebas ampliamente utilizadas, siendo la primera la prueba de antagonismo directo que consiste en hacer desarrollar a la cepa productora de la sustancia inhibitoria junto a una cepa indicadora sensible, luego de este desarrollo o incubación se observan halos de inhibición (enfrentamiento entre células). El antagonismo indirecto consiste en hacer desarrollar a la cepa generadora de la sustancia inhibitoria, luego liberar ella la sustancia inhibitoria por ruptura de su pared celular por mecanismos físicos como la centrifugación, colocarla en pozos de 8 a 10 mm de diámetro en un agar especial de difusión y luego sembrar la bacteria indicadora la cual se desea observar el efecto antagónico (Monroy et al., 2009).

En la obtención de las bacteriocinas y su purificación es necesario tomar en cuenta determinados aspectos de producción como tener en consideración grandes proporciones de cultivos generadoras de sustancias inhibitorias, su valor de pH inicial y su estandarización en el medio de cultivo (Gao, Belkum y Stiles, 1999).

Heredia et al. (2017) y Yang et al. (2004), encontraron que la frecuencia de absorción de las bacteriocinas generadas por los *Lactobacillus* es mayor si se ajusta el caldo de cultivo de la cepa productora a un pH de 6 a 6,5. A este pH permite una fácil separación de las moléculas (absorbidas en las células), del caldo de cultivo por simple centrifugación. Luego, los péptidos son liberados selectivamente de las células a pH bajos (1.5 – 2.0). Este método se presenta como una técnica que produce péptidos con alta potencia y en una forma más concentrada.

2.2.7. Definición de términos básicos.

2.2.7.1 Ecoeficiencia

Se define como proporcionar bienes y servicios a un precio competitivo, satisfaciendo las necesidades humanas y la calidad de vida, al tiempo que se reduce progresivamente el impacto ambiental y la intensidad de la utilización de recursos a lo largo del ciclo de vida, hasta un nivel compatible con la capacidad estimada que puede soportar el planeta (Westreicher, 2021).

2.2.7.2 Lactosuero

Sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche en la elaboración de queso (Poveda, 2013).

2.2.7.3. *Lactobcillus* sp.

Son microorganismos Gram-positivos, no esporulados, y micro aerófilos que producen ácido láctico como producto mayoritario de la fermentación de carbohidratos y productores de metabolitos de efecto antimicrobiano (Axelsson, 2004).

2.2.7.4 Bioconservación

Es la extensión de la vida útil de los alimentos empleando bioconservantes que como microbiota natural, son capaces de sintetizar proteínas (bacteriocinas), a nivel ribosómico que pueden sufrir modificaciones post- tradicionales y tienen efecto antagónico hacia microorganismos con o sin relación filogenética (De la Fuente y Barbosa, 2010).

2.2.7.5 Bacteriocinas

Son péptidos de origen proteico producidos tanto por bacterias gram negativas y positivas, en las que se incluye las bacterias ácido lácticas (BAL); estas proteínas poseen actividad antimicrobiana (Mondragón et al.2013).

2.2.7.6 Microorganismos funcionales e iniciadores

Son aquellos que se caracterizan por generar una serie de metabolitos a favor de la salud y control de agentes microbianos indeseables (Tanya Morocho y Leiva Mora, 2019).

2.2.7.7 Ácidos débiles

Son aquellos que liberan de forma más restringida los protones o iones hidrogeniones con carga positiva. Ejm. Ácido láctico, Ácido acético, Ácido propiónico, ácido fosfórico (Bissonette et al., 2011).

CAPÍTULO III.

MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 UBICACIÓN.

El presente estudio se llevó a cabo en la ciudad de Cajamarca, Provincia y Departamento de Cajamarca, situada en la zona noroeste del Perú, a 2720 msnm de altitud. La parte experimental se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas del Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Cajamarca.

3.2. MATERIALES Y METODOS.

3.2.1. Muestras

Se utilizó 6 litros de lactosuero dulce bovino, proveniente de la elaboración de quesos frescos de las fábricas semi industriales de lácteos de la ciudad de Cajamarca, para aislar *Lactobacillus* sp., a las cuales se les determinó su actividad bactericida.

Se utilizó 6 quesos frescos de 1 Kg cada uno, elaborados de leche fresca bovina por las fábricas semi industriales de lácteos de la ciudad de Cajamarca, para aislar los microorganismos patógenos *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* Enteropatógena.

3.2.2. Medios de cultivo para aislamiento e identificación bioquímica de *Lactobacillus* sp

Los medios de cultivos utilizados son:

- Agar MRS (de Man-Rogosa-Sharpe, MERCK), para la purificación de las BAL.
- Caldo MRS (Man-Rogosa-Sharpe, MERCK)
- Caldo MRS *Lactobacillus* (DIFCOTM)

- Agar MRS modificado utilizado para la prueba de actividad de la cepa de BAL, con la siguiente composición:
 - Peptona de caseína (BIOXON).....10 gr.
 - Extracto de carne (BIOXON).....8 gr.
 - Extracto de levadura (BIOXON).....4 gr.
 - Acetato de sodio (J. T. BAKER)5 gr.
 - Sulfato de magnesio (J. T. BAKER).....0.2 gr.
 - Sulfato manganoso (J. T. BAKER).....0.04 gr.
 - Tween 80.....1 mL.
 - Vitamina. B124.0 mg
 - Lactosa.....10 gr.
 - Agar bacteriológico (BIOXON)..... 14 gr.
- El caldo MRS modificado. - contiene la misma composición, excepto el agar bacteriológico, el cual se le adicionó, Vitamina B12 (2 ampollas de 10 mL) y glucosa 1 gr.
- Galería API 50 CHL. BioMerieux.

3.2.3. Medios de cultivo para aislamiento e identificación de *Salmonella* sp y *E. coli*

Enteropatógena.

Medios de cultivo:

- Agua peptona bufferada (BPW)
- Caldo Peptona
- Caldo Muller - Kauffmann tetracionato/ novobiocina (MKTTn)

- Agar de Soya Tripticasa (BIOXON) para el crecimiento de bacterias patógenas
- Caldo de Soya Tripticasa (BIOXON) para el crecimiento de microorganismos patógenos
- Caldo Peptona
- Caldo BHI
- Caldo lactosa (pre incubación de *E. coli* EP)
- Agar de Soya Tripticasa (BIOXON) modificado al 1% para el crecimiento de las enterobacterias patógenas a evaluar. (detección de la inhibición microbiana de las BAL)
- Agar bacteriológico
- Agar *Salmonella Shiguella*. (SS)
- Caldo BHI (caldo de cerebro y corazón)
- Agar Triple Sugar Iron (TSI)
- Agar úrea
- Caldo úrea
- Caldo lisina decarboxilasa
- Agar LIA (Lisisna-Decarboxilasa Agar)
- Agar Citrato de Simmons
- Caldo triptosa - triptofano
- Reactivos de Kovac's para la reacción de Indol
- Indicador Rojo de Metilo
- Agar Base para Sangre

- Agar nutritivo semisólido
- Solución salina fisiológica
- Kit de pruebas bioquímicas capaz de identificar *Salmonella* sp y *E. coli* Enteropatógena. (Galería API 20 E, bioMerieux)
- Sueros: En el comercio hay disponible distintos tipos de sueros que contienen anticuerpos para uno o varios antígenos O.
- Caldo EC (caldo de *Escherichia coli*).
- Caldo lactosa
- Agar Mac Conkey
- Agar EMB (Eosina Metilen Blue)
- Glicerol al 30%

Reactivos

- Reactivos para la reacción de Voges-Proskauer (VP)
- Reactivos de Kovach
- Kit de la Coloración Gram

Equipos y utensilios

- Autoclave
- Horno
- Estufa de incubación a graduable a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Baño de agua María o estufa de incubación a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Baño de agua María para operar entre 42, 44°C y 47°C.
- Ansa de platino o níquel de aprox. 3 mm de diámetro o 10 μl . 3.1.25.
- Ansa de digraslsky

- pHmetro calibrado con exactitud de 0.1 unidad de pH a 20°C a 35°C.
- Pipetas graduadas o automáticas de 10 ml, 1 ml y 5 ml.
- Pipetas automáticas capacidad nominal, graduadas en 10 a 50 microlitros
- Tubos y frascos de capacidad apropiada.
- Placa de Petri de vidrio o plástico.

3.3. MÉTODOS.

3.3.1. Aislamiento, pureza y conservación de los *Lactobacillus* sp.

- **Aislamiento e identificación de los *Lactobacillus* sp.**

Para el aislamiento e identificación de *Lactobacillus* se adaptó una metodología generada por Khalil el año 2016, así mismo, se hizo uso del manual de Bergey 8^{ava} Edición Métodos y Criterios de Determinación Bacteriológica. Para su aislamiento se utilizó medio cultivo Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) y Agar Man Rogosa para *Lactobacillus* sp.

El aislamiento de las BAL se realizó de 6 muestras de lactosuero dulce con un pH de pH 5,5 + 0.2, obtenidas de 3 establecimientos semi industriales de lácteos de la ciudad de Cajamarca, bajo condiciones adecuadas de higiene, conservación y transporte.

Tabla 1

Muestra de lactosuero dulce de leche bovina y queso fresco artesanal de las plantas lácteas semi industriales de la ciudad de Cajamarca

<i>Industria semi industrial</i>	Nº de muestras suero	Nº de muestras de queso fresco
CHUGUR	6	6
CEFOP	6	6
HUACARIZ.	6	6

Nota. Elaboración propia.

Cada suero fue filtrado y se le midió el pH, luego se tomó cantidades de 300 ml colocados en matraces estériles (6 matraces cada uno con 300 ml de lactosuero), a los cuales se les adicionó 100 ml de Caldo MRS enriquecido con vitamina B12 (02 ampollas de 10 ml.) y glucosa (2gr.), luego se colocó en baño maría a temperatura de $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 horas, con fines de crecimiento inicial (fase de adaptación y crecimiento moderado) y de cierto grado de fermentación. Después de un crecimiento inicial y de la cinética de fermentación se estableció la medición de crecimiento celular. Se determinó la viabilidad celular mediante conteo de unidades formadoras de colonias.

De cada lactosuero enriquecido incubado en baño maría se obtuvieron 25 ml colocándolo en un matraz conteniendo 225 ml. de caldo MRS enriquecido con vitamina. B12 y glucosa, se homogenizó, del cual, se tomó 1 ml de este homogenizado, y se añadió consecutivamente a tubos conteniendo 9 ml de diluyente caldo MRS enriquecido hasta alcanzar las diluciones hasta 10^8 . De cada una de las diluciones, se tomó 1mL que se sembró por la técnica de inoculación en superficie y extensión con varilla de vidrio o aza de

Digraslsky en placas conteniendo agar MRS enriquecido para *Lactobacillus* sp. Se incubaron a $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas en atmósfera microaerófila (5% de O_2). Después de este tiempo, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (ufc/ml), obteniéndose concentraciones celulares de 10^4 , 10^6 y 10^8 ufc/ml.

Tabla 2

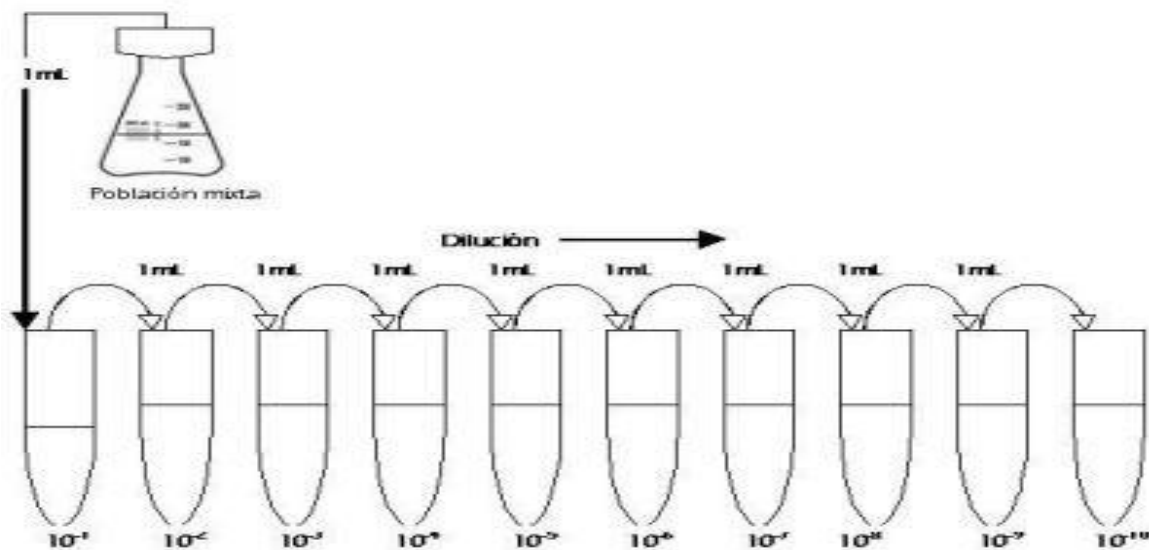
Resultado obtenido en el recuento de unidades formadoras de colonias de Lactobacillus sp.

Dilución	Cuantificación	UFC/ml
10^{-1}	Incontable	-
10^{-2}	Incontable	-
10^{-3}	Incontable	-
10^{-4}	Contable	30 a 300
10^{-5}	Contable	30 a 300
10^{-6}	Contable	30 a 300
10^{-7}	Contable	30 a 300
10^{-8}	Contable	30 a 300

Nota: Elaboración propia.

Figura 1

Esquema de diluciones seriadas para contaje de *Lactobacillus* sp. viables en concentración de células de 10^6 y 10^8 .



Nota. Elaboración propia.

3.3.2. Pureza de los *Lactobacillus* sp.

Después del crecimiento de las colonias se determinó la pureza de los *Lactobacillus* en diferentes concentraciones obtenidas, para lo cual se seleccionó diferentes colonias aisladas en los medios de agar MRS enriquecido con vitamina B12 adicionada con glucosa. Se consideró algunas características de las colonias como tamaño, color, forma, etc. Se sometieron a las pruebas de coloración Gram, catalasa y oxidasa. confirmándose su pertenencia al grupo del género de *Lactobacillus* sp.

3.3.3. Pruebas fisiológicas a realizar

3.3. 3.1. Coloración GRAM

3.3.3.1.1 Extensión y fijación de la muestra

Se colocó sobre un portaobjetos estéril previamente rotulado una gota de agua destilada, luego con la ayuda de un asa de siembra se tomó una colonia o parte de ella correspondiente a la placa de cultivo de la muestra a analizar, luego se mezcló la colonia con la gota de agua, se extendió y se fijó por medio de flameado.

3.3.3.1.2 Aplicación de colorantes y reactivos

Fijada la muestra se cubrió con el primer colorante Cristal violeta por un 1 minuto, se desechó el colorante y se lavó con un chorro moderado de agua, posteriormente se aplicó la solución de Yodo durante un minuto (mordiente), se desechó y lavó con un chorro de agua moderado. Luego se agregó gota a gota la solución de alcohol acetona (decolorante) se dejó reposar por un tiempo de 10 a 20 segundos, luego se lavó con un chorro de agua moderado. Finalmente, se cubrió con safranina Gram (color de contraste) se dejó reposar por un tiempo de 30 segundos, luego se desechó y lavó con un chorro de agua moderado, se secó por flameado y se observó en el microscopio con lente de inmersión (McFarland, 1990). Se observó la presencia de bacilos Gram positivos.

3.3.3.2 Prueba de la catalasa

Con la ayuda de un asa de siembra se tomó una colonia de cultivo puro fresco (10 a 24 horas) y se colocó sobre un portaobjeto estéril, seguidamente se colocó una gota de Peróxido de Hidrógeno al 3% sobre la colonia, si se observa la presencia de efervescencia o

burbujas es una reacción positiva (presencias de la enzima catalasa). En este caso no se observó efervescencia o burbujas (ausencia de la enzima catalasa) (McFarland, 1990).

3.3.3.3 Prueba de la Oxidasa

En una placa Petri con cultivo de colonias del microorganismo en estudio, se agregó sobre una colonia gotas del reactivo para oxidasa (Clorhidrato de tetra métil - p - fenilemdiamina al 1%), en esta reacción no se observó un cambio de color en la colonia a un color rosa – rojo – negro, ausencia de la enzima oxidasa (McFarland, 1990).

Los microorganismos del género *Lactobacillus* son bacterias Gram positivas, catalasa negativa, oxidasa negativa, son inmóviles, como la formación de colonias blancas, algunas pardas irregulares puntiformes.

3.3.3.4 Conservación de las cepas de *Lactobacillus* sp.

Obtenidas las cepas puras en sus diferentes concentraciones ufc/ml fueron conservadas en tubos con 15 ml de caldo MRS suplementado con vitamina B12 y glucosa, más glicerol al 20% como crio protector y se almacenaron a -20°C por un tiempo de 6 horas, en viales para crio preservación. Se añadió un crio protector no iónico, como el glicerol, para reducir la cantidad de hielo que se produce y se evita el aumento de la concentración iónica, protegiéndose así el daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación y en la descongelación.

3.3.3.5 Identificación bioquímica de las cepas de *Lactobacillus* sp. obtenidas

Para la identificación bioquímica de las cepas de *Lactobacillus* o su caracterización fenotípica de estas bacterias se efectúa mediante pruebas bioquímicas utilizando el sistema de galerías estandarizado, API 50 CH (Bio Mérieux, Inc., Hazel Wood Missouri, E.U.),

destinado al estudio del metabolismo de hidratos de carbono para la identificación de cepas del género *Lactobacillus* (De Roissart y Luquet, 1994). El sistema API 50 CHL consta de una serie de galerías que contienen los sustratos fermentables de 49 carbohidratos.

El llenado de los micro tubos del API 50 CHL que contienen los sustratos fermentados es decir la adición del inóculo de *Lactobacillus* sp., su incubación, lectura e interpretación se realizó de acuerdo con la metodología descrita en la ficha técnica incluida en el sistema API 50 CHL (BIOMERIUX).

Preparación de las galerías api 50 CHL Bio Meriux.

- ✓ Cada galería estuvo constituida por 5 filas conteniendo cada una 10 micro tubo numerado.
- ✓ Se preparó una cámara de incubación (tapa o fondo).
- ✓ Se rotuló la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara.
- ✓ Se repartió unos 10 ml de agua destilada en los recipientes del fondo paracrear una atmosfera húmeda.
- ✓ Se sacó cada una de las filas de su embalaje, separaron en dos filas del 0- 19,20- 29, 30-39, 40-49 y se colocan en el fondo de la cámara de incubación.

Preparación del inóculo. - Se consultó la ficha técnica API 50 CHL Bio Meriux.

- ✓ Se utilizó cepas de *Lactobacillus* sp. congeladas por lo que se realizaron 2 sub cultivos en caldo MRS, luego se sembró en Agar MRS por 24 horas a temperaturas de $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, para verificar la viabilidad o la supertenencia de las cepas.
- ✓ Se abrieron tubos de ensayo conteniendo entre 2 a 5 ml de agua destilada estéril.

- ✓ Luego se tomó varias colonias contenidas en las placas con agar MRS, con ayuda del asa de siembra.
- ✓ Se realizó una agitación para su homogenización obteniéndose una suspensión densa en el tubo de agua destilada.
- ✓ Se realizó una suspensión igual a la concentración celular correspondiente (diluciones seriadas).
- ✓ Se transfirió 200µL de la muestra homogenizada.
- ✓ Se abrió una ampolla de API 50CHL Medium e inoculamos. La suspensión se utilizó rápidamente.

Inoculación de las galerías

- ✓ Preparación de las galerías. – Se consultó a la ficha técnica API 50 CHL (Bio Meriux).
- ✓ Repartió la suspensión bacteriana con ayuda de una pipeta estéril en los 50 tubos de las galerías, para esto se inclinó ligeramente hacia adelante la cámara de incubación para darle uniformidad, se evitó formar burbujas de aire y no rebasar la cúpula o micro tubo, con el fin de conservar una buena anaerobiosis.
- ✓ Cuando el tubo y la cúpula se llenaron completamente se recubrieron las celdas o micro tubos con aceite de parafina estéril.
- ✓ La suspensión se utilizó rápidamente.
- ✓ Se incubó las galerías a $34\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

Lectura de la galería. - Se consultó a la ficha técnica API 50CHL Bio Meriux.

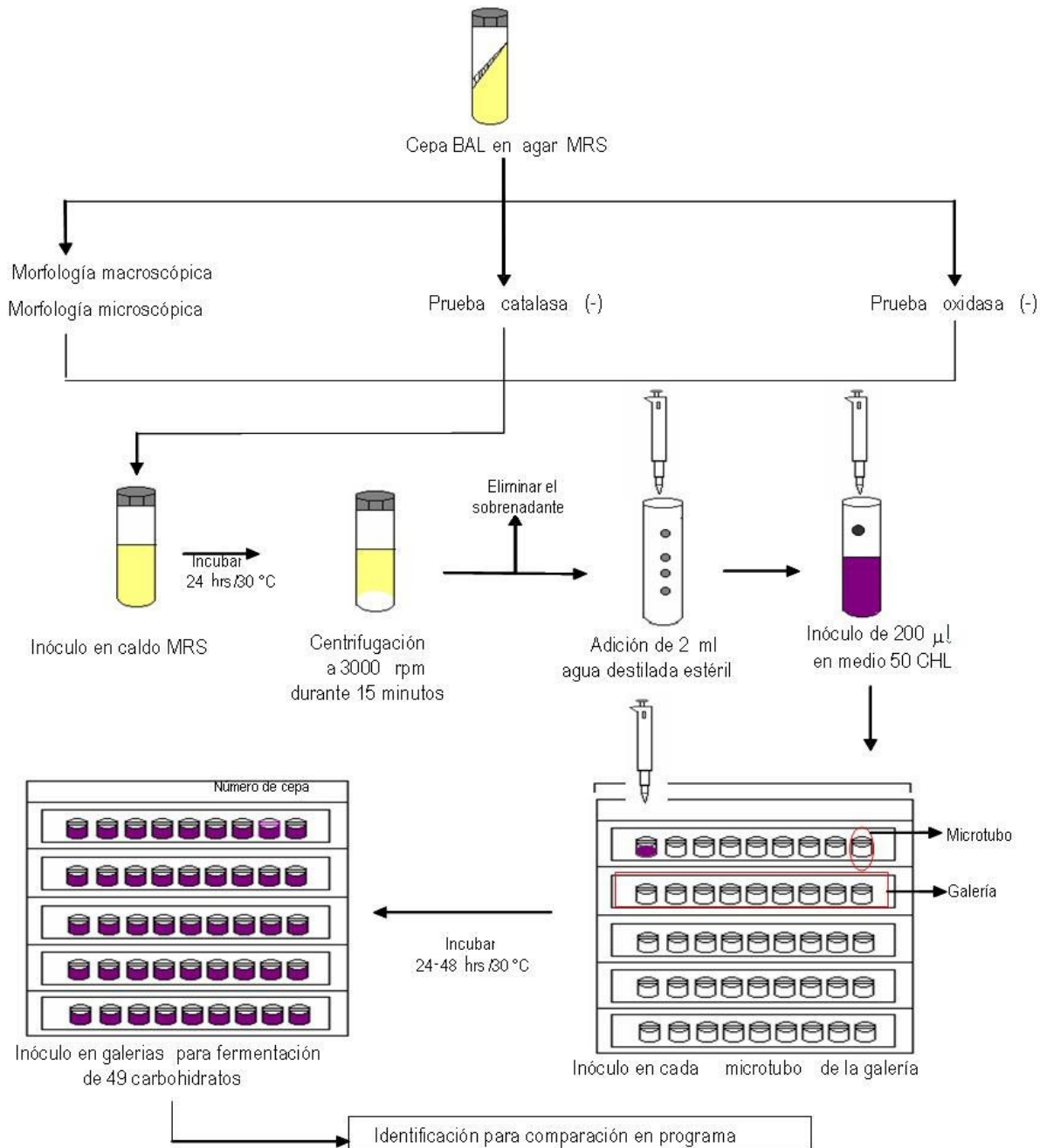
- ✓ Se dio lectura de los micro tubos después de la incubación a temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas.

- ✓ En cada micro tubo se observó la acidificación producida por la fermentación del carbohidrato, que se traduce en un cambio de color del indicador púrpura de bromo resol. En condiciones alcalinas o neutras se mantiene el color púrpura y en condiciones de acides pasa a un color amarillo.
- ✓ En el ensayo de esculina, se observa un viraje de color púrpura negro.
- ✓ Se anotaron los resultados en la hoja contenida en el sistema figura N° 7.

Figura 2

Esquema general de pruebas morfológicas e identificación Bioquímica por el Sistema API


50 CHL Bio Meriux.




Nota. Elaboración propia.


Figura 3

Hoja de interpretación de datos Api 50 CHL.





REF : _____ / _____ / _____
 Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :



45h	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
0	GLY	ERY	DARA	LAPA	FIB	DXYL	LVAL	ADG	ADK	GAL	GLU	FRU	MNE	SSE	RHA	DIL	IND	INN	SOR	ADM	NOG	WAG	ARY	ARB	ESC	SAL	CEL	HAN	LAC	MEL	SAC	TRE	WU	MLZ	PAF	AWD	QVS	XIT	GEN	TUR	LXK	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GHT	ZAG	SKG	

Inoc./Inok./Υλικό ενοφθαλμισμού :

Incub./Inkub./Θερμοκρασία επώασης :

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Nota. Elaboración propia.

Interpretación:

El perfil bioquímico así obtenido pudo ser identificado a partir de la base de datos (V5.0), con la ayuda del programa informático de identificación (figura 3).

Tabla 3

Substratos incluidos en cada uno de los 50 micro recipientes de la galería enzimática para bacterias ácido-lácticas API 50 CH

Tira 0-9	Tira 10-19	Tira 20-29	Tira 30-39	Tira 40-49
Pocillo/substrato	Pocillo/substrato	Pocillo/substrato	Pocillo/substrato	Pocillo/substrato
0. CONTROL*	10. GALactose	20. 1-Methyl-D-Mannoside	30. MELibiose	40. D-TURanose
1. GLYcerol	11. GLUcose	21. 1-Methyl-D-Glucoside	31. Sucrose	41. D-LYXose
2. ERYthrol	12. FRUctose	22. N-Acetyl-Glucosamine	32. TREhalose	42. D-TAGatose
3. D-ARAbinose	13. MaNosE	23. AMYgdaline	33. INUlin	43. D-FUCose
4. L-ARAbinose	14. SorBosE	24. ARButin	34. MeLeZitose	44. L-FUCose
5. RIBose	15. RHAmnose	25. ESCulin	35. RAFFinose	45. D-ARAbitol
6. D-XYLose	16. DULcitol	26. SALicin	36. Starch	46. L-ARAbitol
7. L-XYLose	17. INOsitol	27. CELlobiose	37. GLYcoGen	47. GlucoNaTe
8. ADOnitol	18. MANitol	28. MALtose	38. XyLiTol	48. 2-Keto-Gluconate
9. β-Methyl-D-Xyloside	19. SORbitol	29. LACTose	39. GENtiobiose	49. 5-Keto-Gluconate

Nota. Elaboración propia.

En la práctica, sólo se usan las abreviaturas en mayúsculas de los respectivos hidratos de carbono

3.4. Aislamiento, pureza, viabilidad y conservación de las bacterias patógenas

***Salmonella* sp. y *E. coli* Entero patógena, a partir del queso fresco.**

Se utilizó el Manual de Métodos de Análisis Microbiológicos de Alimentos en Brasil (1997). y sistema automático de identificación bacteriana API Bio merieux API 20 para Entero bacterias (2004).

3.4.1. Aislamiento de *Salmonella* sp.

Procedimiento:

a) Pre - enriquecimiento

Obtención de la muestra. - se obtuvo 6 quesos frescos de leche bovina de 3 empresas lácteas semi industriales de la ciudad de Cajamarca, bajo condiciones adecuadas de higiene. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en tecnopor con gelantes, donde permanecieron en refrigeración (4 a 7°C), por cerca de 6 horas hasta su análisis. En el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y de Aguas del Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Cajamarca.

b) Preparación de muestras compuestas para su análisis.

Se combinó las 6 muestras de queso fresco para formar una muestra de 200 g y se agregó 2,0 litros del caldo de pre enriquecimiento agua peptona bufferada (BPW) a temperatura ambiente. Se tomó 1 ml del homogenizado, y se añadió consecutivamente a tubos conteniendo 9 ml de diluyente de agua peptona buferada, hasta alcanzar las diluciones 10^4 y luego se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

c) Enriquecimiento.

Del cultivo obtenido en la etapa pre – enriquecimiento se transfirió 1 ml a un tubo con 9 ml al caldo Caldo Muller - Kauffmann tetrionato/ novobiocina (MKTTn): se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$.

Aislamiento e identificación en medio selectivo y diferencial

Del cultivo obtenido en la etapa de enriquecimiento en los dos caldos anteriores, se inoculó en un medio sólido selectivo, se usó Agar *Salmonella Shigella* (SS). Luego se

tomó una ansada de los cultivos obtenidos en enriquecimiento (caldo MKTTn) y se estrió en placas Petri con agar SS. Luego se incubó a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$. Después de la incubación se obtuvo la presencia de colonias típicas de *Salmonella*. Las colonias típicas de *Salmonella* que se produjeron en el agar SS fueron transparentes, claras o incoloras. (Supuestos patógenos de *Salmonellas sp*).

3.4.2. Purificación y confirmación de Salmonella.

Se tomó del Agar SS las colonias características de *Salmonella sp*. y se inocularon en tubo conteniendo caldo BHI y se incubaron a temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$. Se obtuvo un cultivo puro la cual se sometió a las pruebas bioquímicas y serológicas que a continuación se detallan:

Prueba de TSI: Con una aguja de inoculación se hizo una punción en el fondo y estrías en la superficie del pico de flauta. Se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18 \text{ a } 24 \text{ h} \pm 3$. Se obtuvo una reacción alcalina (color rojo) en el pico de flauta y en el fondo, con formación de gas y formación de H_2S (ennegrecimiento del agar), lo que es típico de las cepas de *Salmonella*.

Prueba de Urea: Con una aguja de inoculación se sembró en profundidad y en superficie por estrías en el pico de flauta. Se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ y se examinó en intervalos de tiempo de 6 horas. Se observó un crecimiento de la bacteria más no una reacción positiva o presencia de la ureasa en un tiempo de 2 h a 4 h.

Prueba de Caldo Lisina decarboxilasa: a partir del cultivo puro se inoculó con un asa en aro de inoculación por debajo de la superficie del caldo. Se incubó a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Hubo una reacción positiva: coloración violeta característico de *Salmonella*. El aminoácido L-lisina es descarboxilado y desaminado con la formación de la amina cadaverina y la liberación de CO_2 . Esta reacción alcalina compensa la acidificación del medio

causada por la utilización de glucosa y el color violeta se mantuvo estable (dado por el indicador Rojo de Metilo), más la producción de H₂S, dando un color negro.

Prueba de Voges- Proskauer (VP): Se suspendió una ansada en aro del cultivo puro a un tubo estéril con 3 ml de caldo VP, luego se incubó a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3h , después de la incubación se agregó 2 gotas de la solución de creatina, 3 gotas de la solución alcohólica de 1-naftol y 2 gotas de la solución de KOH; se agitó después del agregado de cada reactivo y se observó un color rojizo indicando que el aminoácido L-lisina es descarboxilado con la formación de la amina cadaverina y la liberación de CO₂. Esta reacción alcalina compensa la acidificación del medio causada por la utilización de glucosa y el color rojo violeta se mantiene estable, indicándonos una caracterización bioquímica de *Salmonella*.

Prueba del citrato. _ con una aguja de inoculación se hizo una punción en el fondo y estrías en el pico de flauta en el agar Citrato de Simmons. Se incubó a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h. Después de la incubación se observó un cambio de color en el medio de verde a azul. Indicándonos una reacción característica de *Salmonella*, la cual ha utilizado el citrato de sodio como única fuente de carbono y el fosfato mono amónico (amonio) como fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de bases generadas por la enzima citratasa, generando un medio alcalino. El indicador azul de bromo timol que en condiciones neutras es de color verde, viró a color azul indicando alcalinidad.

Prueba del Índol: Se suspendió una ansada de la cultura pura a un tubo estéril con 5 ml de caldo triptona – triptófano. Se incubó a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h. Después de la incubación se agregó 1 ml de reactivo de Kovacs. Se observó una reacción negativa (ausencia de la enzima triptofanasa que descompone al triptófano en indol amílico y pirúvico): debido a la formación de un anillo amarillo – marrón, característico de *Salmonella*.

Identificación serológica.

Uso de e Investigación de los antígenos somáticos de *Salmonella* (suero anti *Salmonella* “O” polivalente).

1. Se colocó con un asa bacteriológica, dos gotas separadas de solución salina estéril (Na Cl 0.85%) sobre un portaobjetos.
2. Se suspendió en cada una de las gotas, una porción del cultivo puro desarrollado.
3. Se agregó a cada una de ellas una gota del suero anti *Salmonella* “O” polivalente y se mezcló empleando aplicadores de madera estériles.
4. Se agitó inclinando la lámina, para hacer girar las gotas durante aproximadamente un minuto.
5. Se observó bajo una buena iluminación y sobre un fondo oscuro la reacción de aglutinación
6. Se consideró aquí, cualquier grado de aglutinación como positiva.

3.4.3. Aislamiento, identificación, caracterización y conservación de las cepas de *E. coli* Enteropatógena.

Para el aislamiento, identificación y caracterización de *E. coli* Enteropatógena se aplicaron métodos tradicionales microbiológicos, métodos *in vitro* y pruebas serológicas.

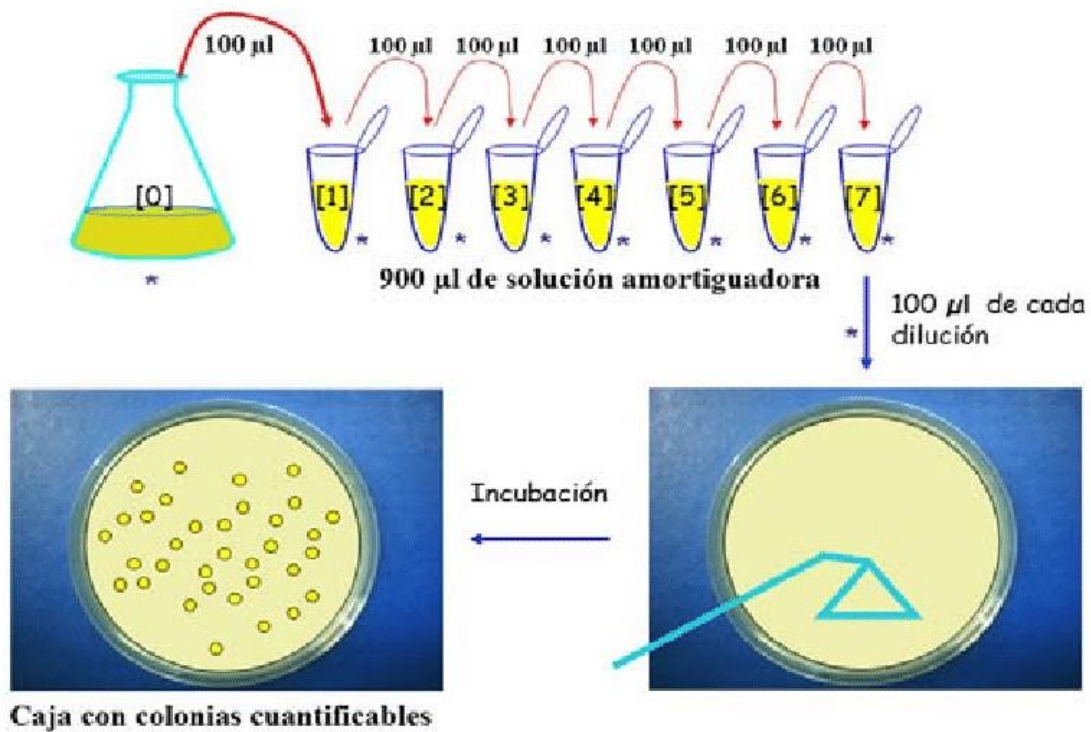
a) Preparación de muestras compuestas para su análisis

Se combinó las 6 muestras de queso fresco para formar una muestra de 200 g y agregó 2,0 litros del caldo de pre enriquecimiento caldo EC a temperatura ambiente. Se tomó 1 ml del homogenizado, y se añadió consecutivamente a tubos conteniendo 9 ml de diluyente de caldo EC, hasta alcanzar las diluciones 10^6 y luego se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

durante $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Luego del proceso de incubación, se tomó el tubo con la concentración celular de 10^6 y con un asa de Digralsky se sembró por agotamiento en superficie en placas con Agar Eosina Metilen Blue (EMB) (cada placa con su dilución correspondiente), se incubaron estas placas a temperatura de $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$., después del proceso de incubación, se tomaron de 5 a 10 colonias típicas de *E. coli*, que presentaron un centro de color oscuro con un brillo metálico en el agar EMB, se inocularon en tubo conteniendo caldo BHI y se incubaron a temperatura de $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$. Se obtuvo un cultivo puro el cual fue sometida a las pruebas bioquímicas y serológicas.

Figura 4

Esquema de diluciones seriadas. - para conteo de microorganismos viables de los Enteropatógenos *E. coli* y *Salmonella* sp.



Nota. Elaboración propia.

3.4.4 Purificación de *E. coli*

Se Realizaron pruebas bioquímicas para la identificación de *Escherichia coli* *Enteropatógena* mediante pruebas (IMViC), Se utilizaron los siguientes criterios:

1. Luego de sembrar en el medio TSI (tres azúcares más hierro) se observó la fermentación de lactosa, dextrosa y sacarosa más la formación gas y ausencia de H₂S en el medio de cultivo TSI (MERCK), reacción característica de *E. Coli* EP.
2. Después de sembrar en el medio de cultivo LIA se observó la descarboxilación de la lisina, en el medio Agar Lisina Hierro o LIA, MERCK).
3. No utilización de citrato como fuente de carbono (Agar Citrato de Simons MERCK), el cual posee un indicador ácido-base (azul de bromotimol). En este caso cuando se sembró en agar Citrato de Simons no se detectó la alcalinización del medio por el consumo del citrato, o ausencia de la enzima citratasa, donde el indicador azul de bromotimol se mantuvo estable con un color verde.
4. Producción de indol (Medio Caldo Triptosa MERCK), Producción de indol se Inoculó el cultivo puro en un tubo con caldo triptosa-tiptofano e incubó a 35°C por 24 ± 2 h. Luego se adicionó entre 0.2 y 0.3 mL del reactivo de Kovacs. Se obtuvo la presencia de una coloración roja (anillo), en la superficie del tubo y se consideró una prueba positiva. Debido a la presencia de la enzima triptofanasa.
5. Se determinó la presencia de la enzima catalasa, colocando 2 ó 3 gotas de solución de peróxido de hidrógeno sobre una gota del cultivo puro de *E. coli*. dando como resultado en la colonia la presencia de efervescencia.

6. Hidrolisis de la úrea (Caldo úrea MERCK). Se inoculó la cultura pura de *E. coli* en el agra Úrea y se observó que esta bacteria no hidroliza la úrea, no se detectó la presencia de la enzima ureasa.
7. Rojo de metilo (RM). Al inocular la cultura pura de *E. coli* en este medio de cultivo líquido se detecta la fermentación ácido-mixta. Se acumulan ácidos (acético, fórmico, entre otros, por la fermentación de la glucosa), relativamente fuertes y bajan el pH del medio hasta 4-5. Dicho cambio de pH se detectó al añadir un indicador (rojo de metilo), al cultivo que cambió a un color rojo púrpura, característico de esta bacteria.
8. Tinción GRAM. - se observó cocobacilos de color rosado, Gram negativos.
9. Simultáneamente, a partir de la cultura pura se sembró en tubos de agar base sangre (BAB) (sin sangre), y posteriormente se realizó la serología con antisuero polivalente A, B o C de EPEC, mediante la prueba de aglutinación.
10. Conservación de las cepas enteropatógenos.

Las cepas puras en sus diferentes concentraciones 10^4 ufc/ml de *Salmonella* sp. y 10^6 ufc/ml de *E. coli* Enteropatógena fueron conservadas en tubos con 15 ml de caldo TSB, suplementado con glicerol al 20% y se almacenaron a -20°C en viales para crio preservación. Antes de cada ensayo las cepas fueron incubadas en su medio óptimo a 35°C por 24h, para reconstituirlas y viabilizarlas.

3.4.5. Determinación de la actividad bactericida de los *Lactobacillus* sp. frente a los patógenos en estudio.

Actividad antimicrobiana se realizó utilizando las técnicas del enfrentamiento del sobrenadante por el método de difusión en placa y la técnica de la doble capa para el

enfrentamiento entre células (Montville y Winkowski, 1997). El sobrenadante que contiene los compuestos bactericidas, se obtendrá por el proceso de centrifugación conjunta de todos los *Lactobacillus* sp. aislados del lactosuero dulce de leche bovina, así mismo, en enfrentamiento entre células se realizará enfrentando a los *Lactobacillus* sp. de forma asociada frente a las bacterias patógenas en estudio. Concluyéndose en la posibilidad de que los metabolitos de acción bactericida generados por *Lactobacillus* sp. y el enfrentamiento entre células eliminen o controlen a las bacterias patógenas.

3.4.5. a. Obtención de los metabolitos antibacterianos libre de células.

Reconstitución y/o viabilización de las concentraciones celulares de 10^4 , 10^6 ; 10^8 ufc/ml de *Lactobacillus* sp., crio conservados.

- **Se aplicó la técnica del vertido en placas.**

Las cepas puras aisladas de *Lactobacillus* en sus diferentes concentraciones ufc/ml contenidos en los matraces con caldo MRS enriquecido con vitamina B12 y glucosa al 10% que fueron crio conservadas, fueron descongeladas en baño María a temperatura de 36°C por un tiempo de 6 a 12 horas.

Después de descongelados los *Lactobacillus* sp. aislados, en concentraciones celulares de 10^4 , 10^6 y 10^8 se inocularon en 3 matraces cantidades de 3 ml en cada matraz que contenía 300 ml de caldo MRS enriquecido con vitamina B12 y glucosa al 10% (cada matraz con su concentración celular correspondiente). Estas concentraciones celulares se incubaron a temperaturas de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por un tiempo de 24 a 48 horas en condiciones de micro aerobiosis. Seguidamente las concentraciones celulares de estos *Lactobacillus* contenidos en los matraces con caldo MRS enriquecido con vitamina B12 y glucosa al 10% fueron conservadas a temperaturas de 4°C a 7°C .

- **Obtención de los metabolitos antibacterianos libre de células de *Lactobacillus* aislados en concentraciones celulares de 10^4 , 10^6 y 10^8 ufc/ml).**

A partir de los matraces conteniendo los cultivos puros de *Lactobacillus* aislados en caldo MRS (enriquecido con vitamina B12 y glucosa al 10%) y en concentraciones celulares de 10^4 , 10^6 ; 10^8 ufc/ml, se colocó cantidades de 5 ml en tubos de centrifuga para luego centrifugar estos cultivos a 3000 rpm por un tiempo de 5 minutos a temperatura entre 4°C y 7°C de las concentraciones celulares. Este proceso se realizó con la finalidad de conseguir la ruptura de la pared de las células de *Lactobacillus* aislados y así obtener el sobrenadante que contiene los metabolitos antibacterianos. Posteriormente, cada sobrenadante libre de células bacterianas se les ajustó el pH a 6,0 con NaOH 1N para tratar de inhibir el efecto de los ácidos orgánicos y finalmente este sobrenadante fue filtrado a través de membranas de 0,22 μ m de diámetro (Svetoslav, 2004).

3.4.5.b. Viabilización de los microorganismos patógenos *Salmonella* sp. y *E. coli*

Enteropatógena en concentraciones celulares de 10^4 y 10^6 ufc/ml, respectivamente.

Las bacterias patógenas obtenidas de los quesos frescos en sus diferentes concentraciones celulares contenidas en matraces con TSB y crio conservadas, fueron descongeladas y reactivadas en baño María a temperatura de $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un tiempo de 6 horas. Después de descongeladas y reactivadas se transfirió 5 ml de cada tubo con la bacteria descongelada en sus concentraciones correspondientes a matraces con 100 ml de caldo TSB (cada bacteria en su matraz correspondiente), Estas concentraciones celulares se incubaron a temperaturas de $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un tiempo de 18 a 24 horas. Las concentraciones celulares de estos patógenos contenidos en los tubos fueron conservadas a temperaturas de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $7\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.5.c. Enfrentamiento entre microorganismos (en diferentes concentraciones celulares).

De los *Lactobacillus* aislados y asociados en las concentraciones celulares ya establecidas y las bacterias patógenas *Salmonella* sp y *E. coli* Enteropatógena ya reconstituidas y viabilizadas y obtenidos en sus diferentes concentraciones (10^4 y 10^6) se procedió a enfrentarlos mediante la técnica de *la doble capa* para el enfrentamiento entre células propuesta por Montville y Winkowski, (1977).

1. Se sembró 1 ml por puntura en placas MRS agar cada una de las concentraciones celulares aisladas de *Lactobacillus* sp. asociados. (10^4 , 10^6 y 10^8 ufc/ml).
2. Luego fueron incubados por un tiempo de 24 a 48 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en micro aerobiosis. Después de este periodo de incubación las placas conteniendo los *Lactobacillus* aislados asociados y en sus concentraciones establecidas,

se cubrieron con una capa de Agar Triplicase Soya (TSA) blando (0,75% de agar), fundido a temperaturas de 45°C que contenían 1 ml de los microorganismos patógenos en su concentración celular evaluado, (1 ml de *Salmonella* sp en concentración celular de 10^4 y en otra placa se colocó 1 ml de *E. coli* Enteropatógena a concentración celular de 10^6 . Luego estas placas fueron incubadas por un tiempo de 18 a 24 horas temperatura de $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3. Después de este periodo de incubación se observó zonas translúcidas, se consideró indicativo de inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas por acción bactericida de los *Lactobacillus* sp aislados por la presencia de halos de inhibición mayores de 1 mm, por lado.

3.4.5.d. Enfrentamiento de los metabolitos (sobrenadante).

Se aplicó el método de difusión en gel por perforación en placa (Malbrán, 2012).

1. A partir de los tubos conteniendo los cultivos puros de *Salmonella* sp. en concentraciones celulares de 10^4 y *E. coli* Enteropatógena en cc celulares 10^6 ufc/ml, fueron sembradas cada una de las bacterias patógenas en placas con agar de difusión el agar PCA, en cantidades de 100 μL , utilizando la técnica de sembrado agotamiento en superficie con la espátula de Digrafsky.
2. Luego de sembradas estas bacterias patógenas cada una en su placa respectiva, se abrieron 6 pocillos, en los que se depositaron en 1 pocillo 50 μL del sobrenadante del cultivo obtenido de los *Lactobacillus* sp. en cc de 10^4 ufc/ml; en el segundo y tercer pocillos se depositaron 50 μL . del sobrenadante del cultivo obtenido de los *Lactobacillus* sp. en cc 10^6 ufc/ml, en el cuarto y quinto

pocillo se depositaron 50 μ L. del sobrenadante del cultivo obtenido de los *Lactobacillus* sp. en cc 10^8 ufc/ml, en el sexto pocillo se depositó solución salina estéril 50 μ L, como control blanco. Antes del proceso de incubación, las placas se almacenaron a temperaturas entre 4°C a 7°C durante 2 horas para permitir la difusión del extracto.

3. Luego se incubaron las placas por 24 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en condiciones de micro aerobiosis, hasta detectar el crecimiento y la aparición de los halos de inhibición. Se detectó el efecto bactericida de los metabolitos de los *Lactobacillus* sp. mediante la inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas, observándose la presencia de un halo de inhibición alrededor del pozo y se consideró inhibición cuando la medida del halo sea mayor a 4 mm de diámetro por lado.

El control negativo de inhibición de crecimiento que se realizó con solución salina estéril, no se observó halo de inhibición.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento, pureza y conservación de los *Lactobacillus* sp. obtenidas a partir del lactosuero dulce de leche bovina.

El lactosuero dulce de leche bovina suplementado con glucosa y vitamina B12, como fuente rica en nitrógeno y carbohidratos, es óptimo para el crecimiento de *Lactobacillus* sp. productores de péptidos de acción bactericida o bacteriocinas, además el presente sustrato contiene altos valores de actividad de A_w , carbono, nitrógeno y fósforo metabolitos importantes en la cinética de crecimiento de los *Lactobacillus* sp. Así mismo, las condiciones de fermentación determinadas por la temperatura de crecimiento que fue de $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, en un ambiente de micro aerobiosis con un tiempo de crecimiento de 24 a 48 horas y el pH inicial y final que generalmente estuvo entre 5.5 a 5.8, más la agitación controlada y aireación, etc., han influenciado en la producción de grandes biomásas de *Lactobacillus* sp. (Francis y Gaona, 2002). Después de la obtención de los *Lactobacillus* en concentraciones celulares de 10^4 , 10^6 y de 10^8 UFC/ml a partir del lactosuero dulce de leche bovina y verificada su pureza, considerándose la morfología típicas de los *Lactobacillus* sp., (colonias blancas puntiformes), Gram positivos (a la coloración Gram) y las pruebas fenotípicas de su tipificación mediante pruebas bioquímicas (prueba de la catalasa, oxidasa y las pruebas bioquímicas del sistema de galerías estandarizado, API 50 CH BioMérieux, Inc., Hazelwood Missouri, E.U. (sistemas destinados al estudio del metabolismo de hidratos de carbono para la identificación del género *Lactobacillus* sp.), fueron enfrentados de forma asociada a los patógenos *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* Enteropatógenos, aislados en concentraciones celulares de 10^4 y 10^6 UFC/gr a partir del queso fresco de leche bovina, determinándose la

acción bactericida de los *Lactobacillus* aislados. Del lactosuero dulce de leche bovina fueron se aislaron y purificaron 08 cepas de *Lactobacillus* sp. A las cuales se les realizó pruebas confirmativas de identificación, como su morfología microscópica y macroscópica (colonias), pruebas bioquímicas presuntivas (prueba de catalasa y oxidasa) y por micro métodos utilizando el sistema API 50 CH Bio Meriux.

Tabla 4

Comportamiento a la coloración Gram y pruebas fenotípicas de tipificación mediante pruebas bioquímicas de tipificación de los Lactobacillus aislados.

Morfología y Coloración	Código de cepas	Prueba de la catalasa	Prueba de la Oxidasa
Bacilos cortos Gram positivos	HUAC.-101,102, 103,104,105,106, 107,108.	Negativo	Negativo
Bacilos cortos Gram positivos	CHUG. 201,202,03,204,205,206, 207.	Negativo	Negativo
Bacilos cortos Gram positivos	CEFOP.301,302,303,304,305,306,	Negativo	Negativo

Nota. Elaboración propia.

Encontrándose las colonias típicas de *Lactobacillus* sp. observadas en el agar MRS cuyo tamaño fue de 1 a 2 mm, color blanco cremoso, de formas fusiformes puntiformes, bordes enteros, superficie convexa, consistencia butirosa y húmeda, bacilos Gram positivos, catalasa y oxidasa negativos, así como, su comportamiento bioquímico característico descrito en el sistema API 50 CHL Bio Meriux, corroborando lo que describió (Sharpe et al., 1979b).

En el presente trabajo nos enfocamos a identificar solo al género *Lactobacillus* sp. ya que en el lactosuero dulce de leche bovina es viable encontrar otros géneros de Bacterias Acido lácticas (BAL) como *Leuconocstoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Coronobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Vagococcus*, descritos por Jay (1992).

Tabla 5

Genero Lactobacillus predominantes en las muestras. (Generadores de metabolitos de acción Bactericida contra los enteros patógenos en estudio).

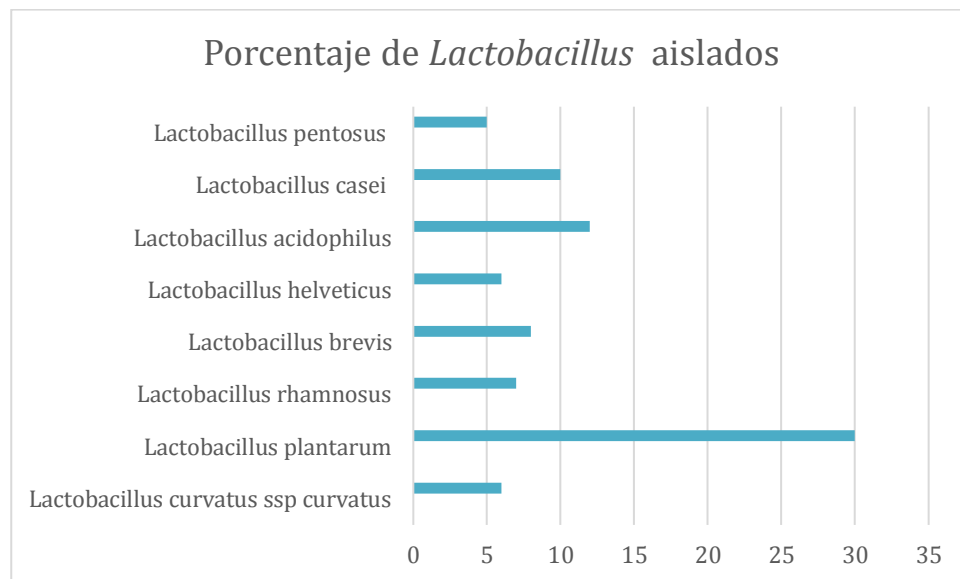
Códigos	Géneros y especie de <i>Lactobacillus</i>	Porcentajes
	<i>Lactobacillus pentousus</i>	10
	<i>Lactobacillus casei</i>	11
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	12
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	6
HUAC	<i>Lactobacillus brevis</i>	8
CHUG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	8
CEFOP	<i>Lactobacillus plantarum</i>	30.3
	<i>Lactobacillus curvatus sub especie curvatus</i>	6

Nota. Elaboración propia.

CH.- Chugur; CEF.- Cefop; H.- Huacariz.

Figura 5

Porcentajes de *Lactobacillus* aislados en las muestras de lactosuero dulce de leche bovina



Nota. Elaboración propia.

Se identificaron 8 especies de *Lactobacillus* por el método rápido de identificación bioquímica API 50CH, las especies identificadas fueron: *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus curvatus* sub especie *curvatus*, los cuales demostraron tener acción bactericida frente a los patógenos en estudio. Se observa que *L. plantarum* se encontró en mayor porcentaje en los lactosueros dulces de leche bovina.

Las 8 cepas aisladas del lactosuero dulce de leche bovina enriquecido con caldo CMRS, vitamina B12 y glucosa, las cuales fueron asociadas y contenidas en caldo MRS mostraron tener una mejor actividad fisiológica de crecimiento generando grandes biomásas

de células bacterianas de *Lactobacillus*, así como una mayor producción y diversificación de metabolitos antimicrobianos.

Monzón (2010), en su trabajo de investigación utilizó el lactosuero dulce obtenido a partir de la producción de quesos panela, suave y blanco de leche de vaca pasteurizada a la cual se le adicionó caldo MRS, para ser utilizado como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus* sp. Dicho sustrato fue esterilizado mediante autoclavado a 121°C y posteriormente se adicionó la cepa de *Lactobacillus* sp. (tabasco), la mezcla fue incubada a 37°C por 24 horas. Se obtuvo una producción de 6.24×10^8 UFC/mL de este microorganismo. La cepa de trabajo mostró una buena capacidad de adaptación al suero de vaca como sustrato. Por lo que este investigador abrió la posibilidad de utilizar el residuo industrial (suero lácteo de vaca), como medio de cultivo para los *Lactobacillus*.

Caballero et al. (2015), que en su estudio aislaron las bacterias lácticas más representativas del lactosuero fresco de leche bovina, donde *Lactobacillus* sp. alcanzó el 87.18% de las bacterias totales identificadas y aisladas. Dentro de las especies pertenecientes al género *Lactobacillus* se encontraron las especies *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum* y *L. fermentum*. En otro estudio similar realizado por el mismo investigador, se detectaron en muestras de lactosuero, seis especies de microorganismos: *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. zae* y *L. hilgardii*, *Pichia kudriavzevii* y *Lactobacillus curvatus*. De otra parte, todas las especies de lactobacilos encontrados, demostraron tener la capacidad de generar metabolitos bactericidas contra Gram positivos y Gram negativos.

Tabla 6

Sensibilidad microbiana. - enfrentamiento entre células.

Variables	Tratamientos	Código		Halo de inhibición	
		R	I	⊖ mm	
CC de BAL	cc celular UFC <i>Lactobacillus sp</i>	cc celular UFC Patógenos	R	I	S
CC de BAL	10 ⁴	<i>Salmonella sp 10⁴</i>	-	-	6
		<i>E. coli EP 10⁶</i>	-	-	5
CC de BAL	10 ⁶	<i>Salmonella sp 10⁴</i>	-	-	7
		<i>E. coli EP 10⁶</i>	-	-	6
CC de BAL	10 ⁸	<i>Salmonella sp 10⁴</i>	-	-	8
		<i>E. coli EP 10⁶</i>	-	-	7
Controles (blanco sin bacterias de <i>Lactobacillus sp</i>), Caldo Peptonado.	CP sin BAL	<i>Salmonella sp 10⁴</i>			Ausencia
	CP sin BAL	<i>E. coli EP 10⁶</i>			Ausencia

Resistente; I.- Intermedio; S.- Sensible; ⊖ mm.- Diámetro en milímetros.

Enfrentamiento entre células. Diámetro Mayor a 1mm = sensible

Nota. Elaboración propia.

Tabla 7

Sensibilidad microbiana. Enfrentamiento de los metabolitos de acción bactericida de los lactobacillus aislados frente a los patógenos aislados de los quesos frescos, E. coli y Salmonella sp.

Variables	Enfrentamiento	Códigos	Halo de inhibición		
			⊖ mm		
μL de metabolitos en cc celular UFC/ml de <i>Lactobacillus sp.</i>	cc celular UFC/ml Patógenos	Patógeno	R	I	S
50μL /Lact.cc. 10 ⁴	10 ⁴	<i>Salmonella sp.</i>	-	-	5
50μL /Lact.cc. 10 ⁴	10 ⁴	<i>Salmonella sp.</i>	-	-	5
50μL /Lact.cc. 10 ⁴	10 ⁶	<i>E. coli EP</i>	-	-	5
50μL /Lact.cc. 10 ⁴	10 ⁶	<i>E. coli EP</i>	-	-	5
50μL /Lact.cc. 10 ⁶	10 ⁴	<i>Salmonella sp.</i>	-	-	8
50μL /Lact.cc. 10 ⁶	10 ⁴	<i>Salmonella sp.</i>	-	-	7
50μL /Lact.cc. 10 ⁶	10 ⁶	<i>E. coli EP</i>	-	-	7
50μL /Lact.cc. 10 ⁶	10 ⁶	<i>E. coli EP</i>	-	-	7
50μL /Lact.cc. 10 ⁸	10 ⁴	<i>Salmonella sp.</i>	-	-	9
50μL /Lact.cc. 10 ⁸	10 ⁴	<i>Salmonella sp.</i>	-	-	10
50μL /Lact.cc. 10 ⁸	10 ⁶	<i>E. coli EP</i>	-	-	8

50µL /Lact.cc. 10 ⁸	10 ⁴	<i>E. coli EP sp.</i>	-	-	7
Con mayor concentración de metabolitos			-	-	
100µL /Lact.cc. 10 ⁸	10 ⁶	<i>E. coli EP</i> <i>Salmonella sp.</i>	-	-	11

Nota. Elaboración propia.

Durante este enfrentamiento se dejaron las placas por un tiempo de 24 horas en la incubadora en micro anaerobiosis, se observó un efecto bactericida en barrido en donde las concentraciones de las patógenas testadas iban siendo eliminados en su totalidad.

Observación

Se combinaron ambos microorganismos patógenos *Salmonella* sp, y *E. coli* EP en concentraciones de 10^4 y de 10^6 , respectivamente, se enfrentaron a los metabolitos antibacterianos en concentraciones de 10^8 de *Lactobacillus* sp. asociados embebidos en papel de celulosa, se encontró una acción bactericida bien marcada, como lo demuestra el halo de inhibición en el centro de la placa de 11mm, que corresponde a la figura N° 5, lo que me demuestra que estos microorganismos patógenos de encontrarse asociados en el queso fresco pueden ser eliminados por estos metabolitos de acción bactericida generados por los *Lactobacillus* encontrados en el lactosuero dulce de leche bovina.

La acción bactericida

Basado en los procesos biológicos de comunicación entre células denominado Quórum sensing o procesos de autoinducción en poblaciones bacterianas, la comunicación entre bacterias o autoinducción en poblaciones muy densas de bacterias, dan lugar a la formación de moléculas químicas que sirven como señal, llamadas “autoinductores”, que son muy variadas de acuerdo al ambiente en que se encuentran y su estructura depende de la especie bacteriana que los produce. Los cuales son liberados a su hábitat o entorno, a medida que aumenta la densidad poblacional, lo que lleva a activar otras vías de señalización que inducen la expresión de genes específicos, que modifican el comportamiento de la población que las genera o altera el comportamiento de otras colonias dentro de un ambiente compartido. De esta manera, las bacterias pueden realizar acciones de forma coordinada, como las relacionadas a la eliminación de organismos indeseables, por la generación o producción de metabolitos antibacterianos.

Estas moléculas señales que se generan a través de las interacciones entre ellas, muchas de ellas son con características específicas predominando las acilhomoserín lactonas (AHLs), que modulan la expresión de genes específicos. dando lugar a una serie de reacciones bioquímicas regulando a la célula para obtener características de beneficio, de adaptación, protección mutua, fortalecimiento de sus mecanismos de acción antagónica frente a otros microorganismos. Lo que demuestra que este proceso de Quórum sensing es activo y significativo cuando se genera un quorum de grandes masas de *Lactobacillus sp*, que relacionado con el presente trabajo en el que hemos utilizados grandes densidades poblacionales de LB, ha generado una serie de moléculas señales en estas interacciones simbióticas, que han dado lugar a la generación de una serie de componentes de efectos bactericida eliminando floras patógenas interrumpiendo en estos microorganismos sus procesos de desarrollo cuando se enfrentan en un mismo ambiente, o cuando estos metabolitos libres de células son obtenidos por centrifugación y enfrentados directamente a los microorganismos indeseables (Sturme et al., 2007).

Según (Sturme et al., 2007), esta función está comúnmente mediada por sistemas reguladores de dos componentes (TCS), que consisten en una proteína quinasa de histidina localizada en la membrana (HPK) que monitorea uno o más factores ambientales, y un regulador de la respuesta citoplasmática (RR), que modula la expresión de genes específicos.

Todas estas potencialidades de las bacterias *Lactobacillus sp*. que involucran el mecanismo de *quorum sensing*, pueden ser utilizadas el control biológico de patógenos en los alimentos. Durante el efecto bactericida es conocido que en la fermentación microbiana generadas por las moléculas señales se reduce las cantidades de carbohidratos disponibles y en este proceso se genera una serie de reacciones bioquímicas dando lugar a la generación de compuestos y moléculas con actividad antimicrobiana, como los ácidos orgánicos

mayormente con características de ácidos débiles (ácido acético, láctico, propiónico, butírico, péptidos antimicrobianos, peróxidos y otros). Que alteran y destruyen la cinética de crecimiento de las bacterias indeseables (Viping, 2015).

Existe información sobre el efecto bactericida de manera individual de diferentes cepas de *Lactobacillus* sp. contra bacterias indeseables gran positivas y grandes negativas obtenidos de sustratos que son diferentes al lactosuero dulce de leche bovina como residuo efluente en la producción del queso fresco, del cual hemos obtenido 08 estereotipos de *Lactobacillus* sp. los cuales fueron asociados en grandes densidades para generar un efecto sinérgico bactericida frente a los patógenos en estudio de la presente investigación encontrándose una alta intensidad de la actividad bactericida de estos LB, demostrado en las pruebas de sensibilidad microbiana. Este resultado de este efecto sinérgico nos da a entender que no hubo un antagonismo entre estos microorganismos funcionales muy probable atraída a un proceso interacción entre células para beneficio mutuo (Viping, 2015).

La alta producción diversificada de los metabolitos de acción bactericida por los *lactobacillus* aislados, como lo son los péptidos antimicrobianos o bacteriocinas, el ácido láctico, el peróxido de hidrógeno y el diacetilos, han demostrado ser eficaces en la eliminación de las bacterias patógenos en estudio. Estos efectos bactericidas, generan alteraciones bioquímicas ocurridos en las diferentes estructuras de las bacterias indeseables, como, por ejemplo, en el caso de los péptidos de cadenas cortas conocidos como bacteriocinas, el blanco primario de este compuesto parece ser la membrana plasmática, alterando su permeabilidad selectiva de la membrana de las células vegetativas sensibles, provocando la inmediata e inespecífica liberación de iones, compuestos de bajo peso molecular y algo más tarde del ATP intracelular, ocasionando la disipación completa o

parcial de la fuerza protón motriz (PMF) dando lugar a desórdenes metabólicos secundarios, que en último término, inhiben la generación de energía y la síntesis de macromoléculas.

En el caso de la acción bactericida del peróxido de hidrógeno se le atribuye su efecto altamente oxidante, mediante la per oxidación de los lípidos de la membrana y la destrucción de la estructura molecular básica de proteínas celulares debido a procesos ionización alterando la gradiente electroquímica de la célula patógena. En el caso del diacetilos este metabolito actúa desactivando enzimas microbianas por bloqueo o por modificación de la zona catalítica. La generación de ácido láctico por estos microorganismos, el cual es catalogado como ácido débil, tiene una gran capacidad de difusión en las células patógenas en estudio, actúan alterando la gradiente electroquímica en el interior de estas las células bacterianas, desnaturalizando el ADN, como también, las proteínas de la membrana citoplasmáticas, todos estos efectos antagónicos suponen una muerte celular (Monteville et al., 1995).

Con respecto a los ácidos orgánicos débiles de efecto bactericida generado por este conglomerado de *Lactobacillus* (ácido láctico, acético y propiónico), demostraron ser estable durante la inhibición de los microorganismos indeseables presentes en la leche fresca, debido a la sostenibilidad de la gradiente electroquímica direccionada aun pH ácido generado. La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos débiles (ácido Láctico, propiónico y acético), 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, ejerciendo efectos de interferir en funciones celulares, como la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa, así mismo, la disociación de los ácidos orgánicos provoca el incremento de protones en el interior celular, lo que conlleva un exceso de protones en el citoplasma de la bacteria indeseable incrementa la capacidad

tampón del citoplasma, dando lugar a que los protones se transportan hacia el exterior de la célula mediante la bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, (alteración de la gradiente electroquímica en la célula indeseable) interfiriendo así con la viabilidad, lo que se corrobora por lo encontrado por (Ouwehand et al., 1999).

Tabla 8

Resumen de sensibilidad microbiana del enfrentamiento de los metabolitos antibacterianos y enfrentamiento entre células.

Sobrenadante (Metabolitos antibacterianos)	<i>Salmonella</i> sp. cc 10⁴	Resistente ⊖ mm	Intermedio ⊖ mm	Sensible ⊖ mm	<i>ECEP</i> cc /Log 10⁶	Resistente ⊖ mm	Intermedio ⊖ mm	Sensible ⊖ mm
50μL /Lact/log 10 ⁴		-	-	5		-	-	5
50μL /Lact /log 10 ⁶		-	-	7		-	-	7
50μL /Lact /log 10 ⁸		-	-	9		-	-	8
Enfrentamiento entre microorganismos		-	-			-	-	
N° células Log 10 ⁴		-	-	6		-	-	5
N° células Log 10 ⁶		-	-	7		-	-	6
N° células Log 10 ⁸		-	-	8		-	-	7
Controles blancos		-	-			-	-	
Control 1 <i>Salmonella</i> sp		-	-	Ausencia		-	-	Ausencia
Control 2 ECEP		-	-	Ausencia		-	-	Ausencia

Control 1	Ausencia	Ausencia
<i>Salmonella</i> sp		
Control 2 ECEP	Ausencia	Ausencia
N° células Log 10 ⁶	Mixtura de <i>Salmonella</i> sp. y <i>E. coli</i> EP en cc celulares de 10 ⁴ y 10 ⁶ , respectivamente.	
Sensible - Ø mm	Se presentó halos de sensibilización de un diámetro de 11.00 mm	

Nota. Elaboración propia.

S= *Salmonella* sp. **ECEP**= *Escherichia coli* Enteropatógena.

R.- Resistente; **I.**- Intermedio; **S.**- Sensible; **Ø mm.**- Diámetro en milímetros.

Metabolitos antibacterianos. Diámetro Mayor a 4 mm = **sensible**

Enfrentamiento entre células. Diámetro Mayor a 1mm = **sensible**

Muchos trabajos de investigación relacionados a la acción inhibitoria de los *Lactobacillus* sp. y de sus metabolitos generados, contra los patógenos alimentarios *Salmonella* sp y *E coli* Enteropatógena, se han realizado enfrentando a los *Lactobacillus* sp de forma individualizada y con halos de inhibición en promedio de 1 a 2 mm.

En el presente trabajo de investigación la acción inhibitoria de los *Lactobacillus* encontrados en el lacto suero dulce de leche bovina, mediante pruebas de inhibición *in vitro* o pruebas de antagonismo directo e indirecto, técnicas ampliamente utilizadas en la identificación de microorganismos de efecto bactericida (Monroy et al., 2009), se realizó de forma asociada (efecto sinérgico de los *Lactobacillus* sp. aislados), hallando un efecto antagónico marcado sobre la fisiología celular de las bacterias patógenas en estudio, eliminándolas, por lo que he determinado que la acción conjunta de estos *Lactobacillus* sp. y de sus metabolitos desarrollan un efecto bactericida muy marcado, como se demuestra en el presente trabajo de investigación con halos de inhibición mayores a 4 mm.

Cabe mencionar que trabajos similares de estos enfrentamientos entre células y del sobrenadante de cultivos de *Lactobacillus* para determinar su actividad bactericida frente a patógenos, mayormente de manera individual, procedentes de alimentos, han sido realizados durante más de 70 años, habiendo recibido, comúnmente, la denominación de antagonismo láctico (Jay, 1997; Ouwehand et al., 1999; Nava, 2008).

En el presente trabajo, el efecto antagónico notorio encontrado contra los patógenos en estudio, fue por la acción conjunta de los diferentes *Lactobacillus* encontrados y de sus metabolitos generados, da a entender una acción directa diversificada de antagonismo sobre la fisiología celular de los patógenos en estudio, durante el enfrentamiento entre células y de sus metabolitos, así como, no se presentó efecto antagónico entre los *Lactobacillus* aislados. En tal sentido este resultado obtenido nos abre la posibilidad de incorporar a estos

microorganismos funcionales obtenidos del lactosuero dulce de leche bovina, (sustrato dispuesto y apropiado), a los procesos productivos en la transformación de la leche, para el control y eliminación de los microorganismos indeseables. Así mismo, este resultado abre la posibilidad de incorporar este lactosuero dulce de leche bovina rica en proteínas o fuentes nitrogenadas, adicionado con vitamina B12 y glucosa, como sustrato adecuado para el desarrollo de *Lactobacillus* generadores de péptidos antimicrobianos, ácidos orgánicos y otros metabolitos de acción bactericida, dando lugar a la generación de grandes masas de *Lactobacillus* sp y adicionarlo a la leche para la producción de quesos u otros derivados, como aditivo biológico en el control de patógenos.

La seguridad de acción bactericida de los *Lactobacillus* sp. frente a los patógenos en estudio, ha sido corroborada y manifestada por varios investigadores a través de muchos trabajos de investigación.

Dentro de estos trabajos de investigación referimos el de Consignado et al. (1993), quienes hallaron actividad antibacteriana en *Lactobacillus casei* a concentraciones celulares de 10^8 UFC/ml frente a *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. Utilizaron el método de placa vertida a partir de un inóculo del presente *Lactobacillus*.

Reque et al. (2000), descubrieron que *Lactobacillus fermentum* mostraba actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, utilizando la técnica de difusión en placa mediante pocillos obteniendo resultados cualitativos del efecto bactericida. No indicando la concentración celular de *Lactobacillus* enfrentados ni la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Asahara et al. (2001), encontraron actividad bactericida en *Lactobacillus casei* frente a *Escherichia coli*. Chuayana et al. (2003), utilizando una metodología no estandarizada, llegaron a la conclusión que *Lactobacillus casei* posee una acción bacteriostática frente a

Escherichia coli y *Salmonella typhi*. En este trabajo no mencionan ningún valor de referencia en cuanto a las concentraciones celulares de *Lactobacillus* enfrentados.

Otros estudios que se han establecido la determinación de la actividad bactericida de los *Lactobacillus* mediante pruebas de difusión en placas con pocillos conteniendo los metabolitos de efecto bactericida, observándose los diámetros de inhibición, como los hallado por (Oyetayo et. al, 2003), quienes verificaron la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* frente a *Escherichia coli*. Así mismo, Nowroozi et al. (2004), ensayaron la actividad de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus acidophilus* frente a *Salmonella typhi*. Erdogru y Erbilir (2006), evidenciaron la actividad bactericida de *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus casei* frente a *Escherichia coli*.

Estrada et al., (2005), en un trabajo de investigación para evaluar el efecto bactericida de los metabolitos obtenidos de las cepas nativas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* aisladas de productos lácteos fermentados, frente a *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* efectuado *in vitro* encontraron capacidad bactericida frente a *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. En este trabajo los *Lactobacillus* nativos aislados fueron desarrollados en caldos de cultivo selectivos MRS, los cuales fueron centrifugados obteniéndose extractos complejos de ácidos orgánicos y péptidos antimicrobianos de acción bactericida. En éstos se observó una mejor actividad antibacteriana y estabilidad de la actividad, cuando fueron almacenados a temperatura de 0°C y 4°C y a pH 5,5. Concluyendo estos investigadores que los extractos sintetizados por ambas cepas tienen un alto potencial bactericida contra los dos patógenos antes mencionados, que son responsables de toxiinfecciones alimentarias. Con respecto a los resultados en la obtención de extractos o metabolitos de acción bactericida a partir de los *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*), aislados de alimentos

lácteos fermentados, se deduce que estos mismos metabolitos de acción bactericida se pueden obtener aislando estos microorganismos a partir del lactosuero dulce de leche bovina.

De otro lado, Aguilar & Bernadette (2011), en el enfrentamiento conjunto de *Lactobacillus* (*L. plantarum* WS4174 y *L. plantarum* LB279), frente a *E. coli* ECO25, que fueron aislados de productos lácteos, encontraron que limitaban el crecimiento de *Escherichia coli* aproximadamente en 3 ciclos logarítmicos y que eran los *Lactobacillus* los que principalmente mediaban el cambio de pH en el medio, siendo *L. plantarum* LB279 la que generó una mayor acidificación, así mismo, en ensayos realizados en caldo MRS y a bajos pH mostraron que la viabilidad de *E. coli* disminuía en un 100% a valores de pH 4.0. que comparado con el presente trabajo de investigación podemos decir que hay cierto grado de similitud.

De manera referencial, Acosta & Ramón (2013), determinaron el efecto antimicrobiano de *Lactobacillus casei* contra *Listeria monocytogenes*, el *Lactobacillus* fue obtenido a partir del lactosuero dulce de leche bovina suplementado con caldo Man Rogosa Sharpe (MRS). La actividad bactericida del sobrenadante obtenido a partir del *L. casei* enfrentado a *L. monocytogenes* se determinó mediante la técnica de difusión por gota. Concluyéndose, que el suero dulce de leche bovina suplementado con caldo MRS puede utilizarse para producir masas de *Lactobacillus* generadores de componentes bactericidas (metabolitos antibacterianos), a partir de *Lactobacillus* sp. aislados de este lactosuero para control de patógenos.

La extracción de los metabolitos bacterianos libres de células, obtenidos por la ruptura de la pared celular de los *Lactobacillus* aislados, mediante centrifugación, y purificados parcialmente durante su obtención neutralizando el pH del caldo MRS a valores entre 5,5 y 6,5, para posteriormente confirmar su actividad bactericida frente a los patógenos estudiados

mediante el método de difusión en gel por perforación en placa a diferentes concentraciones, se determinó que el sobrenadante estudiado mostró una actividad antimicrobiana variable dependiendo del patógeno, presentando un mejor efecto inhibitorio para *Salmonella* sp. que comparado con *E. coli* Enteropatógena, la cual mostró una menor sensibilidad.

En otro estudio realizado por Fuentes et al (2017), encontró que la sensibilidad de los diferentes tipos de *Salmonella* frente a los al ácido láctico y acético metabolitos generados por *Lactobacillus* sp. era muy variable, tal es así, que *S. Typhimurium* resulto ser más sensible a estos metabolitos con un pH de 3,5, con respecto a *S. montevideo*, la cual presento mayor tolerancia a la acides en un pH de 3,5. Concluyendo que la sensibilidad de las *Salmonellas* sp. depende de las cepas y los serotipos de este género.

De otra parte, Pulido (2013), en su trabajo de investigación aisló 7 especies de bacterias lácticas a partir del queso fresco, por el método rápido de identificación bioquímica API 50CH, las especies aisladas fueron: *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei*, *Lactococcus lactis* sp. *hordniae*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus* ssp *curvatus* y *Lactobacillus helveticus*. Las especies con mayor actividad antimicrobiana frente a los microorganismos patógenos indicadores como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* fueron *Lactobacillus curvatus* sp. *curvatus* y *Lactobacillus rhamnosus* con mayor de actividad bactericida, concordando con lo encontrado en el presente trabajo de investigación con lo que respecta a *Escherichia coli*.

En el mismo sentido, Ramírez y Vélez (2016), realizaron un trabajo de investigación para aislar bacterias acido lácticas a partir de leche de cabra y queso fresco artesanal de cabra para determinar su actividad funcional o probiótica especialmente en minimizar y eliminar carga bacteriana indeseable. Lograron aislar, caracterizar e identificar 18 cepas de bacterias

lácticas autóctonas a partir de leche y queso artesanal de cabra, de las cuales 7 correspondieron a cepas de *Lactobacillus plantarum*, 2 cepas de *Lactobacillus acidophilus* 1 cepa de *Lactobacillus paracasei* sp., 4 cepas de *Lactococcus lactis* sp. y 4 cepas de *Leuconostoc mesenteroides* sp. Todas ellas mostraron su capacidad antimicrobiana, por lo que, determinaron la posibilidad del uso del lactosuero dulce de cabra bovina para la obtención de estas bacterias ácido lácticas y utilizarlas en los procesos productivos de la leche, permitiendo con ello mejorar el control sobre los procesos y mejorando la vida útil y calidad microbiológica del producto lácteo terminado, lo que fue refrendado en el presente trabajo de investigación.

En otro estudio realizado por Larrea, Flores y Huapaya (2017), se determinó la actividad antimicrobiana de los metabolitos antimicrobianos de seis bacterias ácido lácticas; *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus* sobre *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*. Durante las pruebas de la actividad antimicrobiana del extracto de componentes antimicrobianos obtenidos a una concentración de *Lactobacillus* de 15×10^8 UFC/mL, se determinó que el mejor efecto bacteriostático y bactericida frente a *Escherichia coli* lo presentó *Lactobacillus fermentum* con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 8 μ L/ml. En el caso de *Salmonella* fue *Lactobacillus acidophilus* el mejor con una CMI de 16 μ L/ml. En el presente trabajo de investigación se utilizó una Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 50 μ L/ml obteniéndose un efecto bactericida alto, pero con la observación de que los 50 μ L/ml de los metabolitos bacterianos se obtuvieron de concentraciones celulares formadas por todas las cepas de *Lactobacillus* aisladas y no de una cepa en específico. En cuanto a las cantidades y/o concentraciones celulares de *Lactobacillus* para la obtención de metabolitos bacterianos de acción bactericida hubo diferencias, ya que

en el presente trabajo de investigación se usó una masa celular de *Lactobacillus* sp. de 10^4 ufc/ml, 10^6 ufc/ml y de 10^8 UFC/ml, concentraciones mayores con respecto al trabajo realizado por Larrea, Flores y Huapaya (2017). Con respecto a las concentraciones celulares de los enteropatógenos enfrentados que oscilaron entre 10^4 en promedio no hubo una diferencia significativa. Por lo que, se puede deducir de ambos trabajos que los metabolitos antibacterianos de efectos bacterias de estos *Lactobacillus* presentan una actividad bactericida en diferentes grados (superior o alto y menor), frente a estos patógenos de acuerdo a las cantidades en $\mu\text{L}/\text{ml}$ de las Concentraciones Mínimas de Inhibición bactericida (CMB).

Se indica que en el presente trabajo se utilizó una CMB de $50 \mu\text{L}/\text{ml}$ obteniéndose una actividad bactericida de grado superior o alto, determinándose que la aplicación de una mayor cantidad de los metabolitos bacterianos de acción bactericida, posibilita un control más eficaz de patógenos. Así mismo, la concentración celular de las bacterias patógenas en estudio se consideró en base a su concentración celular como dosis letal máxima.

Delgado, R. (2008), en su trabajo de investigación sobre el aislamiento e identificación de lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias, encontró una frecuencia constante de la presencia de *Lactobacillus plantarum* en los quesos frescos artesanales de leche bovina. En el presente trabajo de investigación, con la diferencia del sustrato, *Lactobacillus plantarum* también fue la bacteria con mayor presencia en todos los lactosueros dulce de leche bovina, proveniente de las industrias lácteas de Cajamarca. Sobre el efecto bactericida de los metabolitos de esta bacteria contra *E. coli* y *Salmonella* coincide con lo hallado en el presente trabajo de investigación, generándose un control sobre estos microorganismos patógenos.

Extracto de *Lactobacillus* aislados.

Con respecto a los extractos de los *Lactobacillus* encontrados demostraron ser estables a un pH ácido o neutro, así mismo, demostraron una buena conciliación entre ellos con respecto al entorno natural en que se encontraban, dando entender posibles procesos de quorum sensing entre estos *Lactobacillus* sp., a través del intercambio de genes entre ellos para beneficio mutuo.

La comprobación del efecto bactericida de este conglomerado de *Lactobacillus* encontrados en el lactosuero de dulce de leche bovina se realizó en el laboratorio de la Escuela Académico profesional de industrias alimentarias un proceso de elaboración artesanal de Yogurt y de bebidas fermentadas a base de leche fresca bovina, a la cual se le adicionó este conglomerado de *Lactobacillus* sp. encontrados contenidos en lactosuero dulce de leche bovina, para determinar su capacidad de bacteriocinogenicidad es decir la capacidad de sintetizar y eliminar al exterior proteínas y otros metabolitos antagónicos contra enterobacterias (*E.coli*, *Salmonella* sp. y otras) detectadas previamente en la leche fresca bovina antes de ser procesada. Después de 24 y 72 horas del proceso de elaboración se realizó un análisis microbiológico para determinar el efecto bactericida de los ocho *Lactobacillus* aislados y la detección de las bacterias indeseables detectadas previamente en la leche fresca, se pudo observar un efecto bactericida marcado de este conglomerado de *Lactobacillus*, contra estos patógenos e inclusive contra otros grupos de bacterias relacionadas a los productos, según sus criterios microbiológicos establecidos en la Norma Técnica Peruana. También se pudo observar que estos metabolitos generados por estas bacterias (bacteriocinas y otros compuestos), son generalmente estables a pH ácido o neutro, indicando una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen. Además, presentaron una estabilidad al calentamiento a temperaturas de 42°C, que obedecieron al

proceso de elaboración, propiedad que es importante, para así afirmar el uso de este conglomerado de *Lactobacillus* aislados del lactosuero dulce de leche bovina para el control de microorganismos indeseables en otros procesos de transformación de la leche en la industria alimentaria.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. El lactosuero dulce de leche bovina suplementado con caldo MRS, vitamina B12 y glucosa al 10% han permitido obtener biomásas en cantidades considerables de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. de acción bactericida, para el control de *Salmonella* sp. y *Escherichia Coli* Enteropatógena encontrados en los quesos frescos producidos en las plantas semiindustriales de lácteos de la ciudad de Cajamarca, lo que nos da una alternativa beneficiosa para el control biológico de estos patógenos en los procesos de elaboración del queso fresco. No se observó efecto antagónico entre estos *Lactobacillus* sp. aislados.
2. Los metabolitos antibacterianos en concentraciones (CMB) de 50 μ L obtenidos a partir de una asociación de las cepas nativas de *Lactobacillus* en concentraciones de 10^4 , 10^6 y de 10^8 UFC/ml, presentaron un alto efecto bactericida marcado frente a *Escherichia coli* Enteropatógena y *Salmonella* sp. en concentraciones celulares 10^4 y 10^6 , respectivamente. A las 12 horas de incubación ya presentan halos de inhibición entre 1 mm y 4 mm de diámetro, que luego fueron incrementándose a mayor tiempo de incubación (24 h.) según las técnicas de efecto inhibitorio o antagónico realizadas.
3. En el enfrentamiento entre células, los *Lactobacillus* presentaron una aceptable acción bactericida marcada y de barrido en concentraciones celulares de 10^6 y 10^8 UFC/ml frente a las bacterias patógenas asociadas.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar este residuo el lactosuero dulce de leche bovina producto de la elaboración del queso fresco, como sustrato para la obtención de los lactobacilos de efecto bactericida para el control de patógenos frecuentes en los quesos frescos.
2. En este trabajo se estandarizó un mixtura de *Lactobacillus* en concentraciones de 10^4 , 10^6 y 10^8 ufc/ml, que ha permitido el control de los patógenos entéricos estudiados, por lo que se recomienda realizar estudios en la incorporación del lactosuero dulce de leche bovina con las concentraciones de 10^6 y 10^8 ufc/ml de cepas nativas mixturadas de *Lactobacillus* sp., en los flujos productivos de las industrias lácteas para la elaboración del queso fresco y de bebidas fermentadas o su utilización como conservantes biológicos en la elaboración de otros alimentos.
3. El aprovechamiento del efluente lactosuero dulce de leche bovina, producto de la elaboración del queso fresco, rico en microorganismos funcionales y en nutrientes, minimizaría uno de los impactos ambientales más severos que existen, como la demanda biológica de oxígeno y la demanda química del oxígeno en las aguas de los ríos, así mismo, minimizaría los costos en los sistemas apropiados en su tratamiento para el control ambiental de este efluente, en las empresas lácteas de la ciudad de Cajamarca.
4. Los metabolitos antibacterianos obtenidos a partir de la asociación de *Lactobacillus* (bacteriocinas o péptidos antimicrobianos y sus otros componentes como los compuestos no proteicos de bajo peso molecular como el ácido láctico, diacetilo, acetaldehído, reuterina y metabolitos del oxígeno como el peróxido de hidrógeno),

generados, que actuaron de forma asociada y en mayores concentraciones pueden constituirse en una alternativa para el control de patógenos alimentarios, en los quesos de producción semi industrial y artesanal.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, C. y Bernadette, K. (20011). Inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* por bacterias ácido lácticas: presencia de quórum sensing Facultad de Ingeniería. Grupo de Investigación: Procesos Agroindustriales. Campus Puente del Común, Universidad de la Sabana. Autopista Norte Km 21. Chía, Cundinamarca, Colombia. Teléfono: 8615555 ext.: 2513/2532.
- Acosta Q. J. Ramón D. O. (2013). Evaluación del efecto antimicrobiano del sobrenadante producido por *Lactobacillus casei* en suero dulce de leche contra *Listeria monocytogenes*. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 24p.
- Anas, M.; Jamal, H. & Mebrouk, K. 2008. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*. Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Oran University. Oran, Algeria. World Journal of Dairy & Food Sciences 3 (2): 39-49pp.
- Aider, M., D. Halleux and I. Melnikova. 2009. Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. Innovative Food Science and Emerging Technologies 10(3): 334-341
- Alfano, A., G., D., Cimini, D., Fusco, A., Marzaioli, I., De Rosa, M., & Schiraldi.C. (2015). *Lactobacillus plantarum*: Microfiltration experiments for the production of probiotic biomass to be used in food and nutraceutical preparations. Biotechnology Progress, 31(2), 325-333.
- Amorocho Cruz, C. (2011). Characterization and probiotic potential of lactic bacteria isolated from guirra sheep's milk. doi:UPV 3685

- Asahara T.; Nomoto J.; Watanuki M.; Yokokura T. 2001. "Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of escherichia coli urinary tract infection" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45: 1751–1760.
- Axelsson, L. (2004). Acid Lactic Bacteria. Classification and Physiology. En el Libro: Lactic Acid Bacteria, microbiological and funcional aspect. Third ediion. Marcell Dekker Inc. 1 - 65 pp.
- Balciunas, E. M., Castillo Martinez, F. A., Todorov, S. D., Franco, B. D., Converti, A., & Oliveira, R. P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins. *Food control*, 32(1), 134-142. doi:0956-7135.
- Buddingh G y Bergeys . Manual de Bacteriología Determinativa 8ª edición. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1975; 24: 550-550.
- Caballero Jimenez, P., Perez Castro, M., Rodriguez Morgado, B., Parrado Rubio, J. 2015, Lactic acid bacteria from fermented whey as a biocontrol tool against phytopathogenic microorganisms, *Fermentation Technology*, 3(2), 82-82.
- Chuayana, E.; Ponce C.; Rivera M.; Cabrera E. 2003. "Antimicrobial activity of probiotics from milk products" *Phil J Microbiol Infect Dis* 32: 71-74.
- Consignado G.; Peña A.; Jacalne A. 1993. "In vitro study on the antibacterial activity of *Lactobacillus casei* against four diarrhea-causing organisms" *Phil J Microbiol Infect Dis* 22: 50-55.
- Codelac. (2006, Mayo 20). Análisis de la cadena productiva de lácteos Cajamarca. Retrieved from [www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con3_uibd.nsf/.../\\$FILE/218.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con3_uibd.nsf/.../$FILE/218.pdf)

- Crowley, S., Mahony, J., & Van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in food science & technology*, 33(2), 93-109.
- Cuellas, Anahí. (2005). Estudio de un reactor con enzimas inmovilizadas para el procesamiento de suero de quesería. Santa Fe: Universidad Nacional del Litoral, (Tesis de Maestría).
- Cury, K., Arteaga, M., Martínez, G., Luján, D., & Durango, A. (2014). Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteinado) utilizando *Lactobacillus casei*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v. 26, n. 1, p. 137-145.
- De la Fuente N. M., Salcido, J. E. Barboza -Corona.. Inocuidad y bioconservación de alimentos. ISSN 0188-6266, Vol. 20, Nº. 1, 2010, págs. 43-52
- Delgado, R. 2008. Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias. Universidad Nacional Mayor de San Marcos- Facultad de Farmacia y Bioquímica. Tesis para obtener el Grado de Magíster en Microbiología. Lima, Perú. 44(3-11) pp.
- Erdogru O.; Erbilir F. 2006. "Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods" *Turk J Biol* 30: 39-44.
- Estrada, A. C., Gutiérrez, L. A., Ramírez y Olga Inés Montoya, O. I., Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. Volumen 58, Número 1, p. 2601-2609, 2005. ISSN electrónico 2248-7026. ISSN impreso 0304-2847.
- Fooks, L., Fuller, R., & Gibson, G. (1999). Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, 9(1), 53-61.

- Fuentes, M. fanegas¹ , Andrés-Londoño zapata² , Mónica-durango zuleta³ , Margarita-Gutiérrez Buriticá⁴ , Susana-Ochoa Agudelo⁵ , José-Sepúlveda valencia. (2017). Capacidad Antimicrobiana de Bacterias Ácido Lácticas Autóctonas Aisladas de Queso Doble Crema y Quesillo Colombiano. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* Vol. 15 No. 1 (45-55). ISSN - 1692-3561 ISSN - 1909-9959.
- Gao, Y., Belkum, M., & Stiles, M. (1999). The outer membrane of gram negative bacteria inhibits antibacterial activity of brochocin -C. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4329 - 4333.
- González-Martínez, C.; Becerra, M.; Cháfer, M.; Albors, A.; Carot, J.M.; Chiralt, A. (2002). Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. En: *Trends in Food Science & Technology*. 13(9-10):334-240
- González-Siso, M.I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. En: *Bioresourc e Technology*. 1996, vol. 57, no. 1, p. 1-11.
- Heredia-Castro, Priscilia Y., & Hernández-Mendoza, Adrian, & González- Córdoba, Aarón F., & Vallejo-Córdoba, Belinda (2017). Bacteriocinas de Bacterias Ácido Lácticas: Mecanismos de Acción y Actividad Antimicrobiana Contra Patógenos en Quesos. *Interciencia*, 42(6),340-346. ISSN: 0378-1844. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33951621002>.
- Hernández Mendoza, A., Heredia Castro, P., Vallejo Cordova, A., & Vallejo Cordova, B. (2017). Bacteriocinas de Bacterias Acido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), 340-346. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33951621002>

- ICMSF. (1998). Potential application of risk assessment techniques to microbiological issues related to international trade in food and food products. *J. Food Protect.*; 61(8):1075-1086
- Icontec. (2015). Productos Lácteos. Queso Fresco. Norma Técnica Colombiana. Recuperado de http://enormas.icontec.org/icontec_enormas_mobile/visor/HTML5.
- Jay J. M. (1997). *Modern food Microbiology*. 5th Ed. Chapman & Hall, New York, EE.UU.
- Jelen, P. 2003. Whey processing. Utilization and Products. 2739-2745. In: H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox (eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, London, UK.
- Khalil Azizian, Hossein Samadi-Kafil, Behrooz Naghili, Naser Alizadeh, Elham Sheikhsaran, Asghar Tanomand, Rasoul Hosseinpour, Sepehr Taghizadeh. *Ars pharmaceutica*, ISSN-e 0004-2927, Vol. 60, N° 1, 2019, págs. 27-33
- Larrea, H., Flórez, M. y Huapaya, J. (2017). “Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I”. *Revista Horizonte Médico*, Volumen 7, N° 1. Centro de Microbiología y Parasitología Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres. Lima - Perú.
- Kandler, O.; Weiss, N. Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 7th Ed. The Williams and Wilkins C., Baltimore. 1209-1234 pp. 1986.
- Malbrán C. 2012. Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *Microbiol J* 32: 1-43.
- Marcos Balciunas, E., Castillo Martinez, F. A., Dimitrov, S. T., Gombossy de Melo Franco, B. D., & De Souza Oliveira, R. P. (Julio de 2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32, 134 - 142

- Mayra, F. F., Londoño, R. Z., Durango, M. Z., Gutiérrez, M. B., Ochoa, S. A., & Sepúlveda, J. V., Capacidad antimicrobiana de bacterias ácido Lácticas autóctonas aisladas de queso doble crema y quesillo colombiano. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, Vol 15 No. 1 (45-55) 2017. ISSN - 1692-3561 ISSN - 1909-9959. doi: [http://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(15\)45-55](http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)45-55).
- Miller, S., Amadi, V., stone, D., Johnson, R., Hariharan, H. & Zieger, U. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* sp. in small Indian mongooses (*Herpestes auro-punctatus*) in Grenada, West Indies. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37(4), 2014, p. 205-210.
- Mondragón Preciado, G.; Escalante Minakata, P.; Osuna Castro, J. A.; Ibarra Junquera, V. I.; Morlett Chávez, J. A.; Aguilar González, C. N.; Rodríguez Herrera, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 59, 63-69, 2013.
- Monroy Dosta, M. d., Castro Barrera, T., Fernández Perrino, F. J., & Mayorga Reyes, L. (2009). Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*, 73, 63 - 72.
- Montville T.J., Winkowski K., Ludescher R.D. (1995). Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *International Dairy Journal*. Volume 5, Issue 8, 1995, Pages 797-814, ISSN 0958-6946, [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00034-8](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00034-8). Encontrado: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0958694695000348>
- Monzon, T., N. (2010). Uso del residuo de industrias lácteas (suero lácteo de vaca) para la propagación de microorganismos probióticos. Tesis, para para optar el título

- profesional de Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buena Vista Saltillo Coahuila- México.
- Nava J. (2008). Evaluación de Bacterias Ácido Lácticas Comercializadas como Probióticas. Universidad de los Andes. Merida, Colombia.
- Nowroozi J.; Mirzaii M.; Norouzi M. 2004. "Study of *Lactobacillus* as probiotic bacteria" Iranian J Publ. Health 33:1 -7.
- Ouwehand A.C., Kirjavainen P.V., Short, C. & Salminen C. (1999b). Probiotics: mechanism and established effects. International Dairy Journal, 9: 43-52.
- Oyetayo V.; Adetuyi F.; Akinyosoye F. 2003. "Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo" African Journal of Biotechnology 2: 448-452.
- Parashar, A., Jin, Y., Mason, B., Chae, M., & Bressler, D. (2016). Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. Journal of Dairy Science, 99(3), 1859-1867.
- Parra Huertas, R. A. (2010). A Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. Revista de biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, 8, 93 - 105.
- Parra, R. (2009). Importance in the food industry. Revista Facultad Nacional de Agronomía- Medellín, 62 (1), 4967- 4982.
- Petrucci, Ralph H., Herring, Geoffrey H.J., Madura, Jeffry D. y Bissonnette C. Química General. Décima edición Pearson Educación, S. A., Madrid, 2011 ISBN: 978-84-8322-680-3 Materia: 54, Química Formato: 215 * 270 mm Páginas: 1432

- Poveda E, Elpidia. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(4), 397-403. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000400011>.
- Pulido, G. (2013). Aislamiento e Identificación de Bacterias Lácticas Productoras de Bacteriocinas presentes en queso que se elaboran y comercializan en la provincia de huarochiri, departamento de lima. Tesis para optar el título profesional de licenciado en Biología. Universidad Ricardo Palma. FFCCBB. EAP. de Biología. Lima -Perú.
- Ramírez-López, C., & Vélez-Ruiz, J. (2016). Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. *Inf. tecnol*, 27 (6). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-7642016000600012>
- Reque E.; Pandey A.; Franco S.; Socol C. 2000. "Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* lpb for use as probiotic in chickens" *Brazilian Journal of Microbiology* 31:303-307.
- Riveros, M., & Ochoa, T. (2015). Enteropatógenos de importancia en salud pública. *Rev. Perú. med. exp. salud publica*, 32(1), 157-164. doi:ISSN 1726-4634
- Rodríguez, E., Gaya, P., Nunez, M., & M. M. (1998). Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiology*, 39, 129-132.
- Rojas Muñoz, J. (2010). *Scribd*. Recuperado el 3 de 08 de 2013, de <http://es.scribd.com/doc/36605372/Capitulo-03-Bacteriocinas>
- Rzepakowska, A., Zielińska, D., Ołdak, A., & Kołożyn-Krajewska, D. (2017). Organic whey as a source of *Lactobacillus* strains with selected technological and antimicrobial properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(9), 1983-1994. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/ijfs.13471>.

- Sacsquispe Contreras, Rosa. (2002) Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Manual del Instituto Nacional de Salud. 68 p.
- Sánchez-Valdés, J., Colín-Navarro, V., López-González, F., Avilés-Nova, F., Castelán-Ortega, O., & Estrada-Flores, J. (2016). Diagnóstico de la calidad sanitaria en las queserías artesanales del municipio de Zacazonapan. *Salud Pública*, 58, 461-467. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.21149/spm.v58i4.8027>.
- Settharaksa, S. 2008. Isolation and Investigation of the effect of *Lactobacillus* sp. on vaginal bacterial pathogens and formulation of vaginal suppositories. Thesis Magister Pharmaceutical Sciences. Faculty of Pharmaceutical Sciences. Prince of Songkla University, Tailandia. 102 p.
- Sharpe, M. E. (1979b). Identification of the lactic acid bacteria. En: "Identification Methods for Microbiologists", Pp. 233-259. F. A. Skinner and D. W. Lovelock (eds.). Academic Press, London.
- Svetoslav, T., Vaz-Velho, M. & Gibbs, P., Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocina produced by *Lactobacillus plantarum* ST31, *Brazilian J. of Micro-biol*, 35, 157-160, 2004
- Tanya Morocho, Mariuxi, & Leiva-Mora, Michel. (2019). Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro Agrícola*, 46(2), 93-103. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852019000200093&lng=es&tlng=es.
- Touré R, Kheadr E, Lacroix C, Moroni O, Fliss I. (2003). Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Appl Microbiol*. 95:1058-1069.

- Vázquez, S.M., Suárez, H. y Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*. 36(1):64-71
- Vásquez A., V., Salhuana G., J. G., Jiménez D., L. A., & Abanto Ríos, L. M. (2018). Evaluación de la calidad bacteriológica de quesos frescos en Cajamarca. *Ecol. apl*, 17(1).
- Westreicher G. (2021). *Ecoeficiencia*. Economipedia.com. Ecoeficiencia. Definiciones. Disponible en: <https://economipedia.com/definiciones/ecoeficiencia.html>.
- Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY (2014) Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol*. 5: 241.
- Yun, J.-S., Wee, Y.-J., & Ryu, H.-W. (2003). Production of optically pure L (+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(4), 416-423.
- Yin, L., Wu, C., & Jiang, S. (2004). Purification and characterization of bacteriocin from *pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1146 – 1151

ANEXOS

Tabla 9

Pruebas API 50EE de especies de Lactobacillus sp.

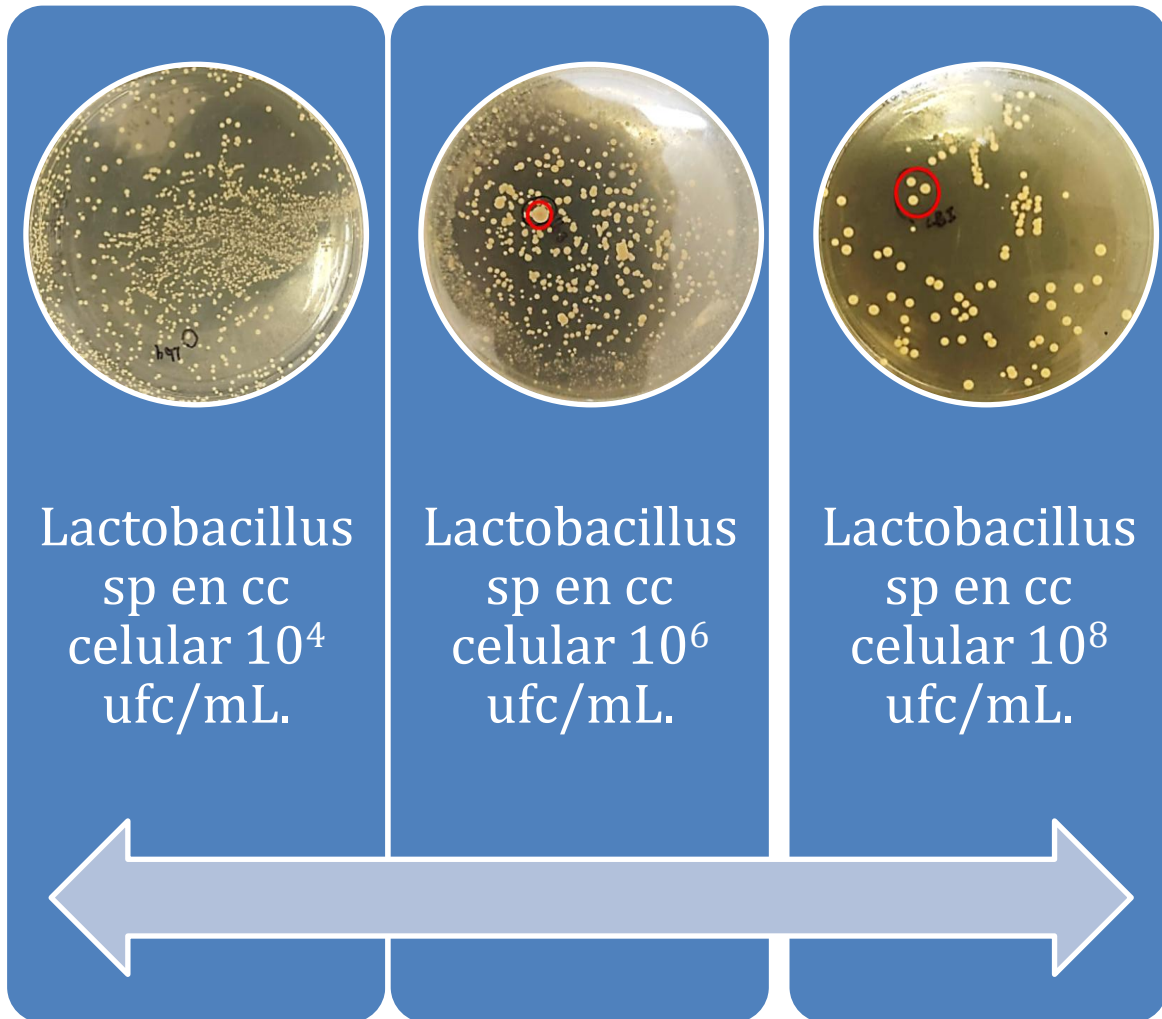
Pruebas API 50E de especies de <i>Lactobacillus</i>								
Género y especie	<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus curvatus sub especie curvatus</i>
HUAC	9	10	11	5	9	7	38	6
CHUG	9	12	15	7	7	9	32	8
CEFOF	12	11	10	6	8	8	21	7
RIB	-	+	-	+	+	+	+	+
DXYL	-	-	+	+	+	V	V	+
GAL	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+
FRU	+	+	+	+	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+	+	+	+	+
SBE	+	+	-	-	+	+	+	-
RHA	+	+	-	-	+	+	+	-
DUL	+	+	-	-	-	+	+	-
INO	-	-	-	-	-	+	-	-
MAN	18 (HUAC)	+	-	-	8 (CHUG)	+	88 (HUAC)	-
SOR	18 (CEFOF)	29(HUAC)	-	-	-	+	89 (CEFOF)	20 (CEFOF)
MDM	10 (CHUG)	-	-	-	-	13 (HUAC)	87 (CHUG)	2I (HUAC)
MDG	10 (CEFOF)	19(CHUG)	-	-	+	+	83 (HUAC)	19 (HUAC)
NAG	17 (CHUG)	25 (CEFOF)	+	(+)	+	21 (HUAC)	90 (CHUG)	22
AMY	15 (CHUG)	16 (CHUG)	-	-	+	+	90 (HUAC)	-
ARB	18 (HUAC)	16 (HUAC)	-	(+)	14 (HUAC)	+	98 (HUAC)	22 (HUAC)
ESC	17 (CEFOF)	30	+	-	15	(HUAC)	84 (CEFOF)	22
SAL	-	27 (CEFOF)	-	-	9 (HUAC)	18 (HUAC)	84 (CEFOF)	22 (HUAC)
CEL	+	28 (CEFOF)	-	(+)	+	20 (CHUG)	80 (HUAC)	22 (CHUG)
MAL	+	12(HUAC)	+	+	+	21	90 (HUAC)	+
LAC	+	+	+	+	+	16 (HUAC)	+	+

MEL	+	22 (HUAC)	+	+	+	+	90 (HUAC)	-
SAC	+	9 (HUAC)	+	+	+	+	+	+
TRE	+	-	+	+	+	+	+	+
INU	-	22 (CHUG)	-	+	-	13 (8CHUG)	-	-
MLZ	11 (CEFOF)	27(HUAC)	-	-	9	15 (CHUG)	88 CHUG)	19 (HUAC)
RAF	13 (HUAC)	30	11	+	6 (HUAC)	(CHUG)	81 (HUAC)	-
AMD	2 (CHUG)	22 (HUAC)	-	-	10 (HUAC)	+	+	20 (HUAC)
GLYG	-	-	-	-	-	-	89 (CHUG)	-
GEN	7(HUAC)	30	-	(+)	7 (CHUG)	+	86 (CHUG)	-
TUR	17 (CEFOF)	30	-	(+)	+	+	90 (CHUG)	+
LYX	-	19 (CHUG)	-	-	-	+	-	-
TAG	14 (HUAC)	17 (CHUG)	-	-	9 (HUAC)	+	39	+
LFUC	10 (CEFOF)	11 (CHUG)	-	-	9 (HUAC)	+	-6	-
DARL	12 (HUAC)	-	+	-	-	-	83 (HUAC)	-
GNT	14(CHUG)	8 (CEFOF)	-	-	9 (HUAC)	(CHUG)	83	20 (HUAC)
2 OGNT	12 (CHUG)	15 (CEFOF)	-	-	15	-	(HUAC)	-
5 OGNT	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota. Elaboración propia.

Figura 6

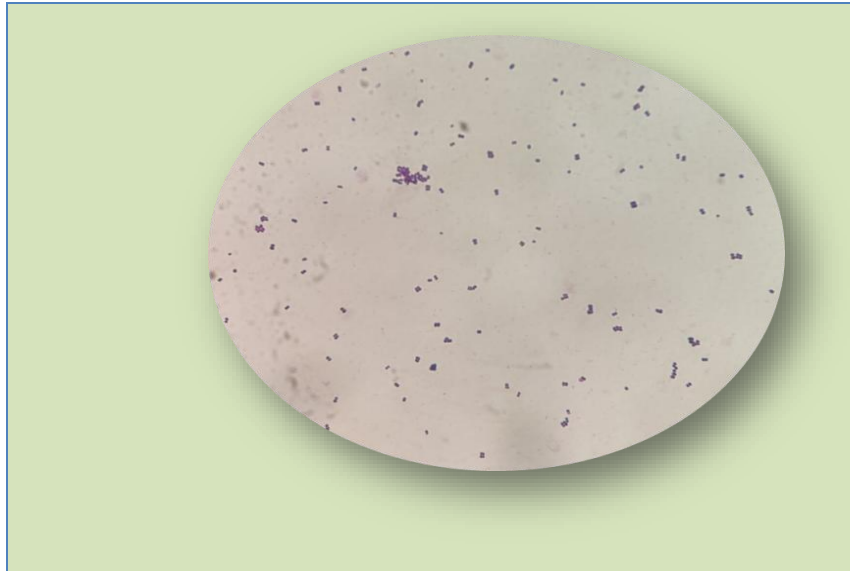
Concentraciones de Lactobacillus sp. aislados del lactosuero dulce de leche bovina.



Nota. Elaboración propia.

Figura 7

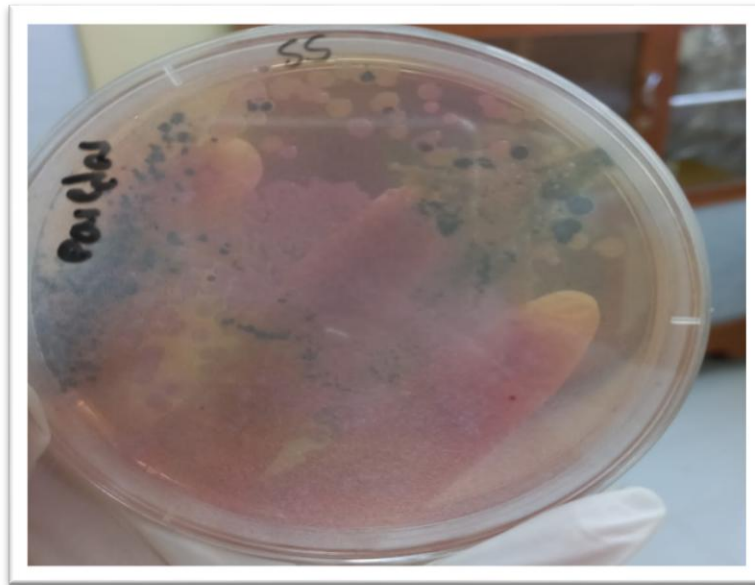
Coloración Gram. - Lactobacillus sp. Gram +



Nota. Elaboración propia.

Figura 8

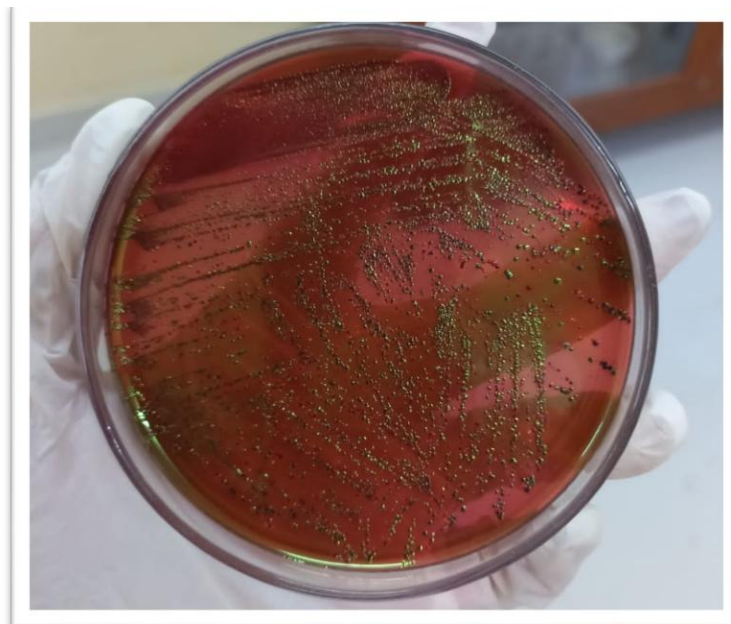
Salmonella sp. aislada del queso fresco de leche bovina



Nota. Elaboración Propia.

Figura 9

E. coli Enteropatógena aislada del queso fresco de leche bovina



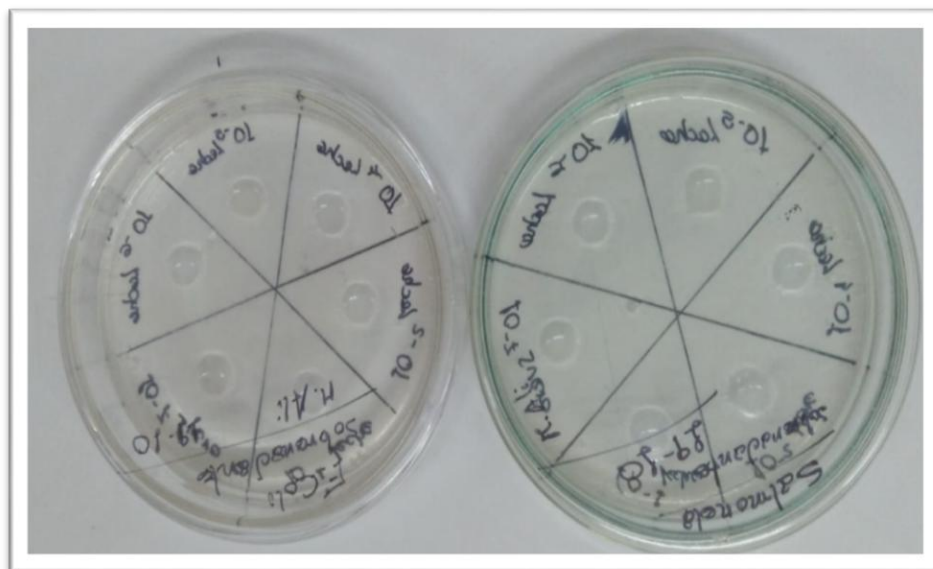
Nota. Elaboración Propia.

Figura 10

Observación de los halos de inhibición.

*Enfrentamiento de los metabolitos (sobrenadante). Metabolitos antibacterianos libres de células obtenidos de los *Lactobacillus* sp aislados del suero dulce de leche bovina y asociados en concentraciones celulares de 10^4 , 10^6 , 10^8 , enfrentados a *E. Coli* EP en cc celular de 10^6 y a *Salmonella* a cc celular de 10^4 .*

Se aplicó el método de difusión en gel por perforación en placa.

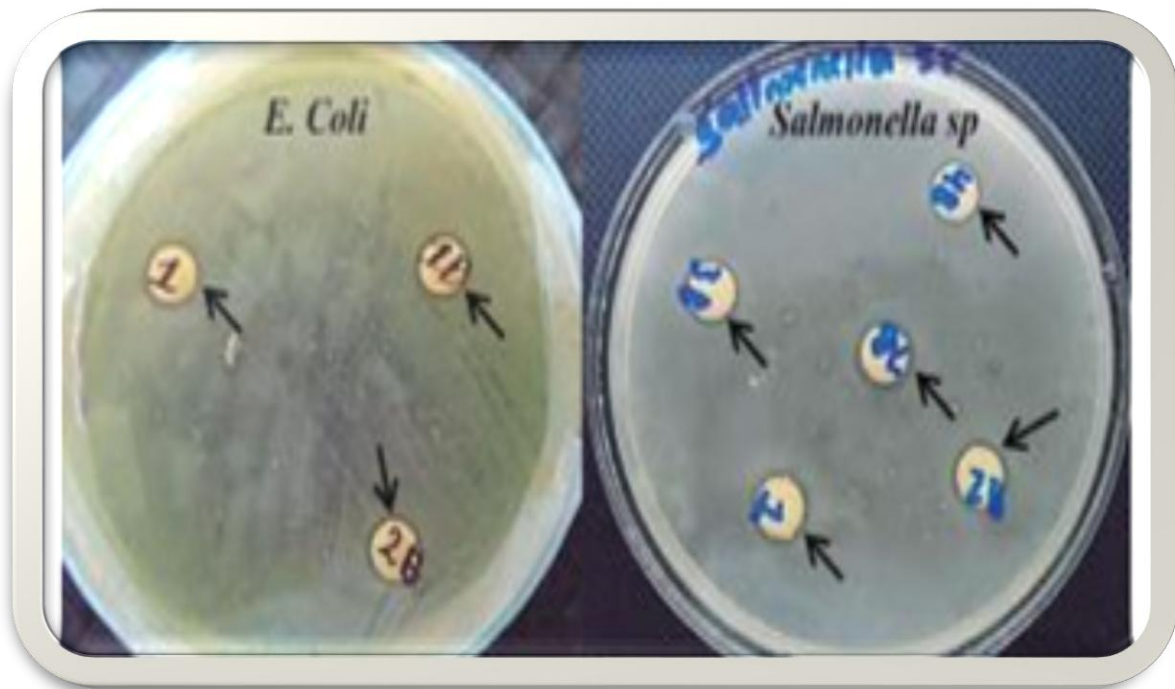


Nota. Elaboración propia.

Figura 11

Inhibición a las 12 horas de incubación del enfrentamiento entre células. Efecto inicial de barrido.

*Lactobacillus asociados, en concentraciones 10^6 ufc/ ml, aislados en suero de leche Bovina enfrentados con los patógenos *E. coli* enteropatógenos y *Salmonella* sp. en concentraciones de 10^6 y 10^4 respectivamente.*



Nota. Elaboración propia.

Figura 12

Inhibición a las 24 horas de incubación del enfrentamiento de los metabolitos de los Lactobacillus sp. asociados, aislados en suero dulce de leche bovina en concentración celular de 10^4 , 10^6 , 10^8 , contra los patógenos E. coli enteropatógenos en cc celular de 10^6 y Salmonella sp. en concentración celular de 10^4 , y en celulosa embebido con metabolitos obtenidos a concentración celular de 10^8 de los lactobacillus aislados de suero dulce de leche bovina.

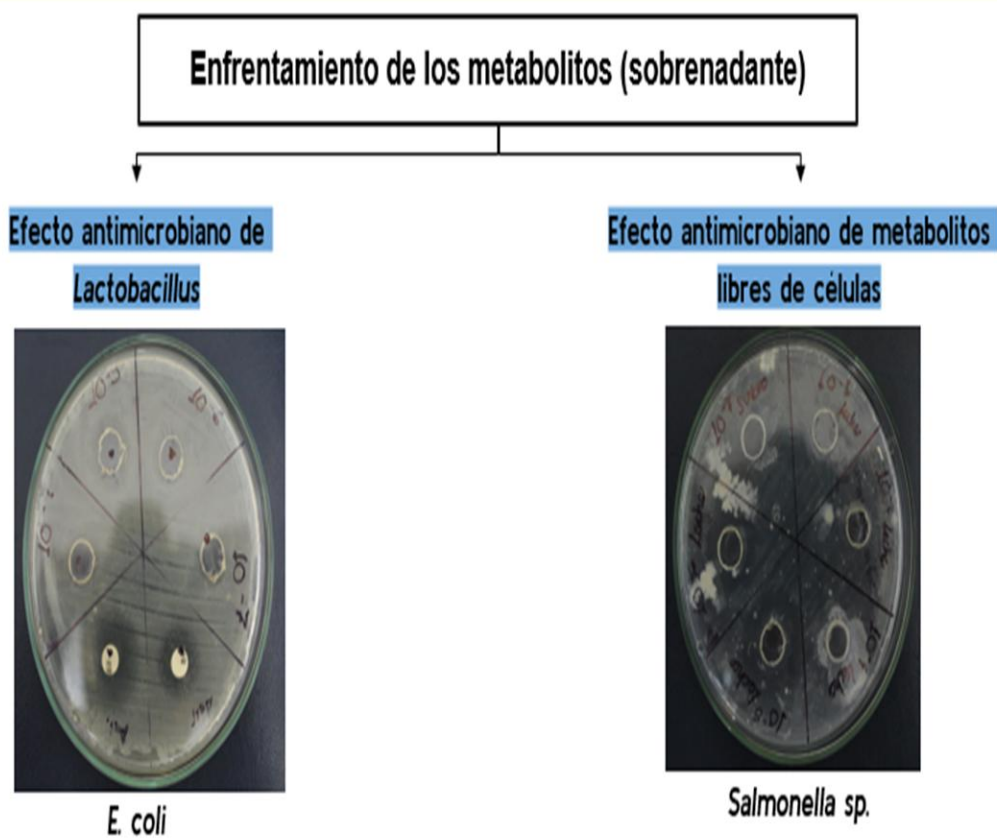


Nota. Elaboración propia.

Figura 13

Actividad Bactericida. - Inhibición a las 48 horas de incubación del enfrentamiento entre células de los Lactobacillus sp. asociados, aislados en suero dulce de leche bovina contra los patógenos E. coli enteropatógenos y Salmonella sp.

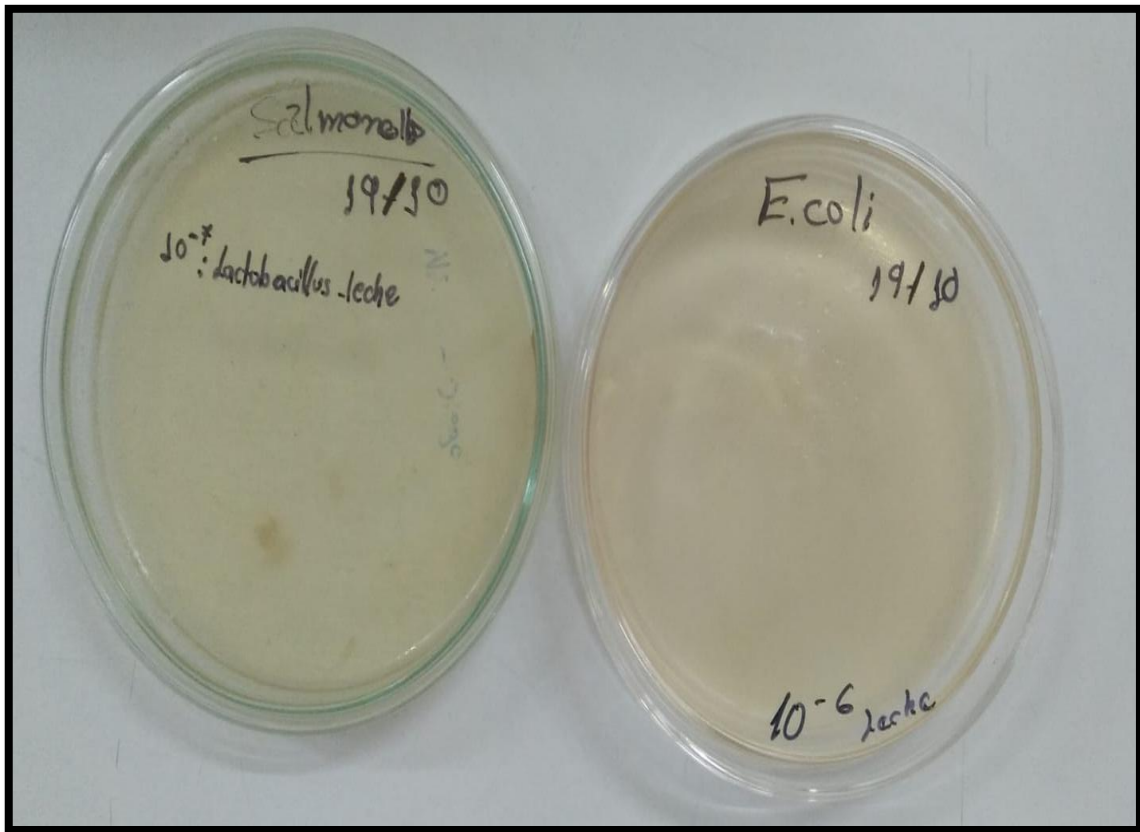
Actividad antagónica de *Lactobacillus* frente a *E. coli* y *Salmonella sp.*



Nota. Elaboración propia.

Figura 14

Método de enfrentamiento entre células asociadas. Inhibición a las 24 horas de incubación
enfrentamiento entre células. Lactobacillus asociados aislados en suero dulce de leche frente
a E. coli EP y Salmonella sp. se denota diámetros de inhibición entre 2 a 4 mm.



Nota. Elaboración propia.

Figura 15

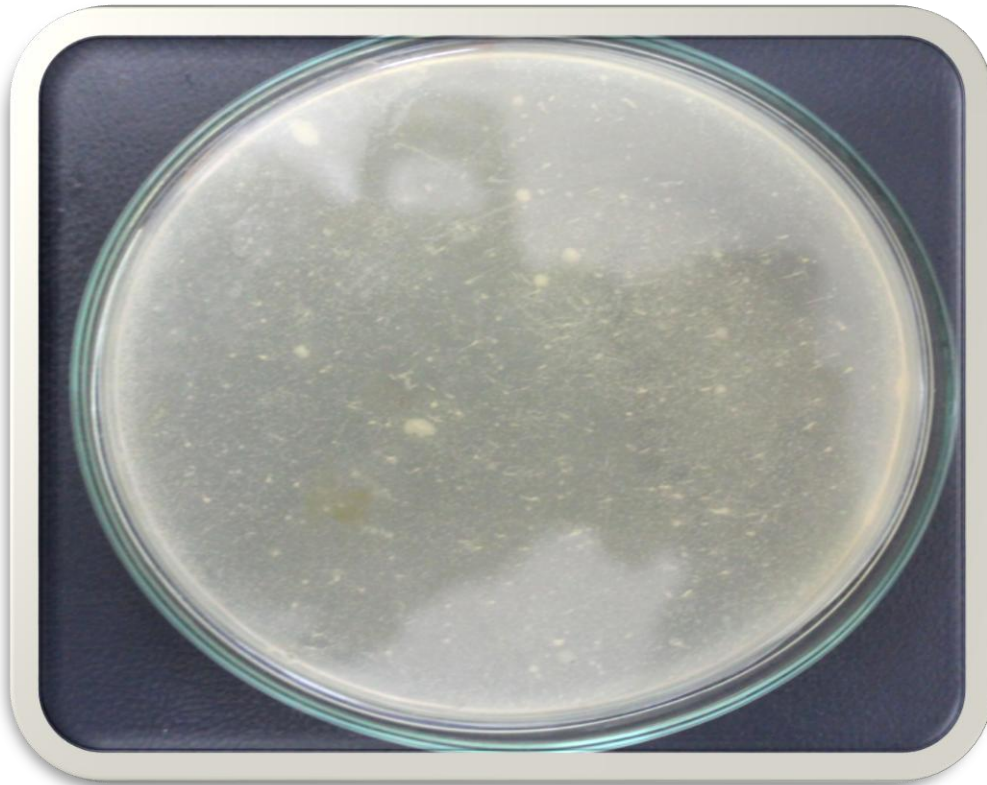
Enfrentamiento entre la asociación de E. coli Enteropatógena a concentración celular de 10^6 y Salmonella sp. a concentración celular de 10^4 frente a los Lactobacillus aislados a concentración celular de 10^6 , a las 24 horas de incubación.



Nota. Elaboración propia.

Figura 16

Enfrentamiento entre la asociación de E. coli Enteropatógena a concentración celular de 10^6 y Salmonella sp. a concentración celular de 10^4 , frente a los Lactobacillus aislados a concentración celular de 10^8 , a las 48 horas de incubación.



Nota. Elaboración propia.