



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
CAJAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E. A. P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**



TESIS

**“EFECTO DE LAS BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
PROVENIENTES DE YOGURT PROBIÓTICO SOBRE EL CRECIMIENTO
DE *Salmonella* spp Y *Staphylococcus aureus*”**

**PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. CARLOS JHOSEF MEJÍA GONZÁLES

ASESOR:

DRA. CONSUELO BELANIA PLASENCIA ALVARADO

CO-ASESOR:

MG.SC. PAIRAZAMÁN QUIROZ OMAR DANIEL

CAJAMARCA – PERÚ

2022

COPYRIGHT ©

CARLOS JHOSEF MEJÍA GONZÁLES

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Mejía, G. 2022. **Efecto de las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas provenientes de yogurt probiótico sobre el crecimiento de *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus***

Carlos Jhosef Mejía Gonzáles

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesora: Dra. Consuelo Plasencia Alvarado

Co-Asesor: M. Sc. Omar Pairazamán Quiroz

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo – UNC

2023

**EFFECTO DE LAS BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
PROVENIENTES DE YOGURT PROBIÓTICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE
*Salmonella spp. Y Staphylococcus aureus***

AUTOR: Bach. Carlos Jhosef Mejía Gonzáles

ASESORA: Dra. Consuelo Plasencia Alvarado

CO-ASESOR: M. Sc. Omar Pairazamán Quiroz.

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo –
Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



Presidente
John Victor López Orbegozo



Secretaria
Claudia Carolina Rodríguez Ulloa



Vocal
Luis Gilberto García Izquierdo

Cajamarca, 2023 - Perú

MODALIDAD "A"

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

En Cajamarca, siendo las 5:05 pm del 18 de enero del año 2023, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente II -304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: "Efecto de las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas provenientes de yogurt probiótico sobre el crecimiento de *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*", del Bachiller en Ciencias Biológicas: Carlos Jhosef Mejía Gonzáles.

Siendo las 5:45 pm del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: **MUY - BUENO**, con el calificativo de **17**, con lo cual el Bachiller en Ciencia Biológicas se encuentra **APTO** para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Jurado Evaluador:

Presidente: M.Cs. John Víctor López Orbegozo

Secretario: Dr. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

Vocal: Dr. Luis Gilberto García Izquierdo

Asesor: Dra. Consuelo Plasencia Alvarado

Co-asesor: M.Cs. Omar Daniel Pairazamán Quiroz


.....
Presidente
John Víctor López Orbegozo


.....
Secretaria
Claudia Carolina Rodríguez Ulloa


.....
Vocal
Luis Gilberto García Izquierdo


.....
Asesora
Dra. Consuelo Plasencia Alvarado


.....
Co-asesor
M. Sc. Omar Pairazamán Quiroz


.....
Tesista
Bach. Carlos Jhosef Mejía Gonzáles

A:

Mis amados Padres, Amalia Gonzáles Gonzáles y Segundo Mejía Chávez; a mis amadas pareja e hija, Deysi Sanchez Alfaro y Valeria Mejía Sanchez, por ser mi inspiración y por enseñarme cada día lo bello de la vida, por esforzarse por mí y guiarme en este camino a ser un profesional. A mi amada madre que desde el cielo sigue cuidándome día a día para que pueda llegar a ser lo que ella tanto anhelaba

“La única forma de hacer un gran trabajo es amando lo que haces”

Steve Jobs.

Agradecimiento

Primero agradecer a Dios por darnos un día más de vida; a mi abuelito, hermana, sobrina y toda mi familia en general por su apoyo incondicional durante todo el tiempo que ha conllevado este camino.

A mis asesores, la Dra. Consuelo Belania Plasencia Alvarado y el Mg. Sc. Omar Daniel Pairazamán Quiroz, por su preocupación y por su guía durante este trabajo de investigación, por darse el tiempo necesario para la revisión, correcciones y orientaciones para que el trabajo se realice de la mejor manera.

A la empresa OC S.R.L. por haberme acogido tan amablemente en sus instalaciones y brindarme el material y equipos necesarios para desarrollar gran parte de este trabajo de investigación, además de brindarme la orientación necesaria cuando fue requerida.

A mis amigos Christian, Osmar, Luis, Evelyn y Antony por su afecto y apoyo incondicional durante toda la vida universitaria, por todas las alegrías y tristezas compartidas.

Y un agradecimiento especial a mi amigo Juan Manuel Montoya Salazar, por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo, por ser un mentor y por conseguir el acceso al Laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes.

Tabla de contenido

Título.....	xii
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes de la investigación.....	3
2.2. Bases teóricas.....	6
2.2.1. Bacterias ácido lácticas (BAL).....	6
2.2.2. Bacteriocinas.....	9
2.2.3. <i>Salmonella</i> spp.....	16
2.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
CAPÍTULO III.....	19
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS.....	19
3.1. Nivel de Investigación.....	19
3.2. Tipo y diseño de estudio.....	19
3.3. Marco muestral.....	19
3.3.1. Material biológico.....	19
3.3.2. Unidad de estudio.....	19
3.4. Recolección de muestras.....	19
3.5. Aislamiento de bacterias ácido lácticas.....	20
3.6. Caracterización bioquímica de bacterias ácido lácticas.....	20
3.7. Identificación molecular de bacterias ácido lácticas mediante el gen 16S.....	21
3.8. Evaluación de producción de proteínas mediante la reacción de Biuret.....	21
3.9. Producción del extracto crudo de bacteriocinas.....	22

3.10. Sensibilidad a los antibióticos de los aislamientos de <i>S. aureus</i> y <i>Salmonella</i> spp	23
3.11. Evaluación de la capacidad antibacteriana del extracto crudo de bacteriocinas	24
3.12. Procesamiento y análisis de datos	24
CAPÍTULO IV	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. Resultados	26
4.1.1. Aislamiento de bacterias ácido lácticas	26
4.1.2. Caracterización bioquímica.	26
4.1.3. Identificación de bacterias ácido lácticas mediante el gen 16S ARNr	27
4.1.4. Determinación cualitativa de proteínas	28
4.1.5. Producción del extracto crudo de bacteriocinas	29
4.1.6. Sensibilidad a los antibióticos de los aislamientos de <i>S. aureus</i> y <i>Salmonella</i> spp	29
4.1.6. Evaluación de la capacidad antibacteriana del extracto crudo de bacteriocinas	31
4.1.7. Análisis estadístico	32
4.2. Discusión	33
CAPÍTULO V	41
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
5.1. CONCLUSIONES	41
5.2. RECOMENDACIONES	42
LISTA DE REFERENCIAS	43
APÉNDICES	49
ANEXOS	60

Lista de abreviaciones

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

CN: Gentamicina

CLSI: Estándares Clínicos y de Laboratorio

MRS: Agar Man, Rogosa y Sharpe

MRS broth: Caldo Man, Rogosa y Sharpe

RPM: Revoluciones por minuto

SPSS: Software Statistical Package for Social Sciences

TE: Tetraciclina

Glosario

Medio Man, Rogosa y Sharpe: Es un medio selectivo para el aislamiento de bacterias lácticas, como son los lactobacilos, lactococos, pediococos, etc. El medio incluye peptona y glucosa, encargadas del crecimiento bacteriano, y citrato, el cual inhibe el crecimiento de bacterias gram negativas(4).

Microorganismos competidores: Microorganismos que poseen un tiempo de duplicación más corto y que se desarrollan en un ambiente o producto específico, el cual posee una flora autóctona, entre estos encontramos a los coliformes o a las bacterias ácido lácticas(2).

Cultivo iniciador: Son microorganismos que se adicionan a los alimentos con el fin de aprovechar los compuestos o productos derivados de su metabolismo o de su actividad enzimática(24).

Extracto crudo: Sustancia obtenida por extracción luego de la fermentación de inóculos bacterianos en medios óptimos de desarrollo(10).

**EFFECTO DE LAS BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
PROVENIENTES DE YOGURT PROBIÓTICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE**
Salmonella spp Y Staphylococcus aureus

Resumen

En este estudio se evaluó la inhibición del crecimiento de *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus* expuestos a los extractos crudos de bacteriocinas producidos por bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de yogurt probiótico expendido en la ciudad de Cajamarca. Se obtuvo un total de 5 aislamientos que fueron caracterizados tanto bioquímica como molecularmente, se logró la identificación de *Aerococcus viridans*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* y dos aislamientos de *Streptococcus thermophilus*. Se realizó la producción del extracto crudo de bacteriocinas de cada aislamiento en medio MRS broth, el cual fue incubado por 48 horas en un shaker orbital a 30 °C y 150 rpm, el sobrenadante fue centrifugado a 10000 rpm, se filtró con poro de 0,22 µm, fue sometido a estrés térmico a 80 °C y neutralizado con NaOH 1M; con la finalidad de inactivar el resto de componentes en el sobrenadante. La capacidad inhibitoria de las bacteriocinas producidas se evaluó mediante la técnica de difusión en disco usando 25 µL del extracto para impregnar los discos que fueron colocados en las placas inoculadas con *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus*; se obtuvo perfiles de sensibilidad de 66,7 % para *A. viridans*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* y de 50 % y 33,3 % para los dos aislamientos de *S. thermophilus*, con lo que se determinó la capacidad inhibitoria de las bacteriocinas producidas por estas BAL, además, mediante la prueba de ANOVA se precisó estadísticamente que existe diferencia significativa en cuanto al comportamiento de los extractos de bacteriocinas y los antibióticos Gentamicina y Tetraciclina; no obstante, ambos tratamientos mostraron ser capaces de inhibir el crecimiento de *Salmonella* spp y *S. aureus*.

Palabras clave: Bacteriocina, Bacterias ácido lácticas, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, yogurt probiótico

Abstract

In this study, the inhibition of growth of *Salmonella* spp and *Staphylococcus aureus* exposed to crude extracts of bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) isolated from probiotic yogurt sold in the city of Cajamarca was evaluated. A total of 5 isolates were obtained that were characterized both biochemically and molecularly, the identification of *Aerococcus viridans*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* and two isolates of *Streptococcus thermophilus* was achieved. The crude extract of bacteriocins of each isolate was produced in MRS broth medium, which was incubated for 48 hours in an orbital shaker at 30 °C and 150 rpm, the supernatant was centrifuged at 10,000 rpm, filtered with 0 pore size. 0.22 µm, was subjected to thermal stress at 80 °C and neutralized with 1M NaOH; in order to inactivate the rest of the components in the supernatant. The inhibitory capacity of the bacteriocins produced was evaluated by the disk diffusion technique using 25 µL of the extract to impregnate the disks that were placed in the plates inoculated with *Salmonella* spp and *Staphylococcus aureus*; sensitivity profiles of 66.7 % were obtained for *A. viridans*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* and 50 % and 33.3 % for the two isolates of *S. thermophilus*, thus determining the inhibitory capacity of the bacteriocins produced by these LAB, in addition, through the ANOVA test, it was statistically specified that there is a significant difference in terms of the behavior of the bacteriocin extracts and the antibiotics Gentamicin and Tetracycline; however, both treatments were shown to be capable of inhibiting the growth of *Salmonella* spp and *S. aureus*.

Keywords: Bacteriocin, Lactic acid bacteria, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, probiotic yogurt

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son uno de los grupos de bacterias beneficiosas que mayor valor presentan en la actualidad, debido a la capacidad probiótica que poseen y a la importancia que representan en el mercado internacional, en el cual significaron una inversión de 46 mil millones de dólares en el año 2019 y se estima que esta inversión aumente a 75 mil millones de dólares para el año 2026, lo cual conllevará a un aumento considerablemente en las investigaciones con estas bacterias y con las sustancias que producen, las cuales se consideran seguras para el consumo, siendo las bacteriocinas una de las sustancias de mayor interés(1).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos bioactivos, los cuales son secretados extracelularmente por las bacterias que los producen, debido a esto no se necesita lisar las células para obtenerlos. Son de gran interés en el campo científico debido a su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos competidores, tales como los del ámbito clínico, esto gracias a que su capacidad antimicrobiana es distinta a la manifestada por los antibióticos de amplio espectro que son usados en la actualidad(2); o los del campo alimenticio, donde se destaca su uso para la conservación de alimentos, siendo la bacteriocina más representativa la nisina A, la cual está aprobada para su comercialización en más de 60 países(1).

Una de las principales ventajas del uso de bacteriocinas en lugar de antibióticos es la dificultad que poseen para generar resistencia en los microorganismos patógenos en

comparación con los antibióticos de amplio espectro utilizados actualmente; además, las bacteriocinas tienen la facultad de ser biodiseñadas debido a sus simples mecanismos biosintéticos, con lo cual se puede mejorar su actividad inhibitoria o su especificidad contra microorganismos seleccionados. Estas capacidades tan interesantes llaman la atención de los investigadores para tratar de descubrir, identificar y estudiar nuevas bacteriocinas(1).

Las bacteriocinas son la opción correcta para satisfacer a consumidores que optan por conservantes de origen natural y también para ayudar a combatir la problemática que implica la resistencia bacteriana la cual nos aqueja en la actualidad; una alternativa para demostrar la capacidad antibacteriana de las bacteriocinas sin someterla a purificación debido a su alto costo es la evaluación del extracto crudo, el cual se utiliza principalmente en temas de calidad alimentaria y productos lácteos(3). Con estas consideraciones, el presente trabajo de investigación evaluó la capacidad antimicrobiana de los extractos crudos de bacteriocinas de los aislamientos de BAL obtenidos de yogurt probiótico sobre aislamientos de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp para determinar si son o no efectivos contra estas bacterias y así dejar un precedente para investigaciones futuras que quieran caracterizar y cuantificar estas bacteriocinas.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Según Vélez y Ramírez en el año 2016(4), el uso de medios de cultivo como Man Rogosa Sharpe (MRS) y el Rogosa agar (LBS), les permitió aislar bacterias ácido lácticas a partir de leche y queso artesanal obtenidos de un hato caprino de Puebla-México; las condiciones de cultivo para los medios MRS y LBS fueron de 35 °C por 24 a 48 horas en un ambiente microaerófilo. Se reportó la presencia de 10 cepas de *Lactobacillus*, 4 cepas de *Lactococcus* y 4 cepas de *Leuconostoc*; resaltando así la eficacia del MRS para el aislamiento de bacterias ácido lácticas.

Yi Lanhua *et al.*(5), purificaron y caracterizaron una nueva bacteriocina producida por *Lactobacillus crustorum* en la ciudad de Xinjiang-China, para lo cual aislaron la BAL a 37°C por 48 horas en jarras de anaerobiosis; en cuanto a la producción de la bacteriocina usaron el caldo MRS y 30 °C durante 78 horas como condiciones de crecimiento; además evaluaron el rango de pH y la actividad antimicrobiana a distintos niveles de temperatura (60 °C, 80 °C, 100 °C y 121 °C). Los resultados obtenidos indican que la bacteriocina presenta un rango de tolerancia de pH muy amplio: 2 a 11; además se comprobó que la bacteriocina fue tolerante al estrés térmico, además, no encontraron diferencias significativas en cuanto a la inhibición de los microorganismos cuando se sometió a la bacteriocina a distintas temperaturas.

En el año 2017 fueron aisladas 12 bacterias ácido lácticas (BAL) de yogurt, y queso hilado comercial y artesanal producido en la región de Huila-Colombia; para el

aislamiento de las BAL usaron el medio MRS y como condiciones de crecimiento: 37 °C por 48 horas. La capacidad antimicrobiana de las BAL aisladas fue evaluada utilizando la técnica de discos y la técnica de pocillos, mediante 3 métodos (con presencia de células, ausencia de células y ausencia con pH neutro). Se determinó que los 2 primeros métodos fueron efectivos al inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, a comparación del tercer método en el cual no se observó una inhibición considerable(6).

Rivera de la Cruz *et al.*(7), aislaron 31 bacterias ácido lácticas a partir de queso expendido en Jalisco-México, emplearon para el aislamiento el agar MRS e incubaron en jarras anaeróbicas a 37 °C por 72 horas; posteriormente las BAL se incubaron durante 3 días en caldo MRS, consecuentemente evaluaron la acción del sobrenadante para lo cual se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos y finalmente usaron 20 µL del sobrenadante sobre discos de 5 mm de diámetro, los cuales colocaron en placas previamente sembradas con *Salmonella*; obteniendo que solo 11 de los aislamientos manifestaron inhibición del crecimiento contra *Salmonella enterica var. Typhimurium*, de los cuales solo tres manifestaron halos de inhibición de tamaño considerable en comparación con las otras 8 cuyos halos fueron muy pequeños.

Soares Vitola *et al.*(8), realizaron una investigación en el año 2018 en Pelotas-Brasil, la cual evaluó el efecto de dos bacteriocinas (nisina, pediocina) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, para esto usaron 2 concentraciones de nisina y 3 de pediocina contra 7 aislamientos de *Staphylococcus aureus*, sin embargo, solo se observó la inhibición del crecimiento bacteriano en las placas en las que se utilizó nisina en comparación con los cultivos en los que se usó pediocina en las cuales no se observó inhibición contra *Staphylococcus aureus*, además no se observó una diferencia

significativa en cuanto a la inhibición con relación a la concentraciones utilizadas.

Soma *et al.*(9), en el año 2018 en Mumbai-India, realizaron una investigación para caracterizar el extracto crudo de bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* aislada de suero de leche casero, para esto se evaluaron factores como la temperatura, pH y resistencia a enzimas. Se determinó que la producción óptima de bacteriocina se daba a un pH de 5 a 7, a una temperatura entre 28 °C a 30 °C, no obstante, se comprobó que la bacteriocina era estable a un amplio rango de pH (3-11), incluso pudo tolerar una temperatura de 121 °C durante 20 min y además fue resistente a lisozima y a tripsina. En cuanto a la capacidad antimicrobiana, determinaron la producción de bacteriocina usando el extracto crudo contra la cepa indicadora *Enterococcus faecalis*, seleccionando los aislamientos que producían zonas de inhibición ≥ 8 mm de diámetro.

En el año 2018 se llevó a cabo una investigación realizada en Colombia, la cual tuvo como objetivo evaluar el efecto de extractos obtenidos de bacterias ácido lácticas sobre cepas de *Salmonella* spp. Fueron aisladas 98 bacterias ácido lácticas provenientes de leche cruda de vaca, para la producción de los extractos crudos se utilizó el caldo MRS. Sin embargo, luego del proceso de obtención del extracto crudo se observó que ninguno de estos aislamientos generó algún halo de inhibición sobre el crecimiento de *Salmonella* spp. Esta investigación resalta que el resultado negativo se debe a que *Salmonella* es una bacteria gram negativa(10).

Akbar Ali *et al.*(11)., en el año 2019 estudiaron el potencial antimicrobiano de *Lactococcus lactis subps. lactis* aislado de leche fermentada recolectada en la región de Bangkok en Tailandia contra aislamientos gram positivos (*Staphylococcus aureus*,

Listeria monocytogenes) y gram negativos (*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*); para el aislamiento de las BAL usaron el agar MRS y como condiciones de cultivo una temperatura de 37 °C por 48 a 72 horas. Obtuvieron mejores resultados con las bacterias gram positivas en las cuales se reportó halos de $21,2 \pm 1,2$ mm en el caso de *Staphylococcus aureus* y de $27,3 \pm 1,4$ mm con respecto a *Listeria monocytogenes*; En el caso de los aislamientos gram negativos se reportó halos de $11,2 \pm 1,72$ mm contra *Salmonella typhimurium* y de $13,4 \pm 1,15$ mm contra *Escherichia coli*.

López T. *et al.*(12), en el año 2021 en San Lorenzo-Paraguay, determinaron que 8 aislamientos de bacterias ácido lácticas inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Este efecto quedó evidenciado al usar los métodos de antibiograma, en el cual usaron tres procedimientos que consistieron en enfrentar el sobrenadante libre de células de un cultivo de 19 horas de incubación, el sobrenadante libre de células de un cultivo de 93 horas de incubación y el sobrenadante sin tratamiento alguno de un cultivo de 24 horas de incubación; y la prueba en medio líquido, obteniendo mejores resultados con cultivo de 19 horas y con las pruebas en medio líquido.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas fueron descubiertas en el año 1873 por Joseph Lister cuando analizó una muestra de leche. Posteriormente en 1919 Orla- Jensen las clasificó en dos grupos (homofermentativas, heterofermentativas), teniendo como base sus características fenotípicas, ruta fermentativa y temperatura ideal de crecimiento. Con respecto a la

asimilación de oxígeno pueden manifestarse como: anaerobias facultativas, anaeróbicas, aeróbicas y microaerófilas(13).

Son conocidas también como las bacterias de las fermentaciones alimentarias, las cuales tienen como característica ser microorganismos gram positivos, los cuales morfológicamente pueden manifestarse en forma de cocos o bacilos, teniendo como una de sus principales características el sintetizar su ATP a partir de la fermentación láctica de los glúcidos, obteniendo el ácido láctico como único producto final en el caso del grupo de las homofermentativas y produciendo etanol, CO₂ y acetato en el caso del grupo de las heterofermentativas(14).

Las bacterias lácticas pueden ser encontradas en productos fermentados como la leche y derivados, productos cárnicos y vegetales; su presencia en estos alimentos proporciona un mayor sabor, textura e incrementa el valor nutricional de los alimentos; cuando fermentan carbohidratos suelen liberar sustancias que poseen capacidades antimicrobianas, entre estas podemos encontrar: ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas las cuales son péptidos de peso molecular bajo(6).

Estos péptidos de bajo peso molecular siguen siendo al día de hoy de gran interés debido a que son producidos por bacterias ácido lácticas, las cuales tienen la clasificación de QPS (Qualified Presumption of Safety), lo que significa que su consumo no ocasionará ningún efecto adverso en su consumidor, esto puede ser corroborado por las distintas generaciones de la humanidad ya que las han ido consumiendo tanto ellas como a sus

metabolitos en alimentos fermentados sin que se manifestaran efectos adversos(15).

2.2.1.1. Clasificación de las bacterias ácido lácticas por su ruta metabólica

BAL homofermentativas.

Son las que generan ácido láctico como único producto al final de la degradación de los carbohidratos, con un rendimiento neto de dos moles de ácido láctico por un mol de glucosa(Figura 1)(14), entre los géneros bacterianos que forman este grupo encontramos a: *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*(16); estas bacterias se caracterizan por usar la vía metabólica Embden-Meyerhoff-Parnas, esto debido a que poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa(17).

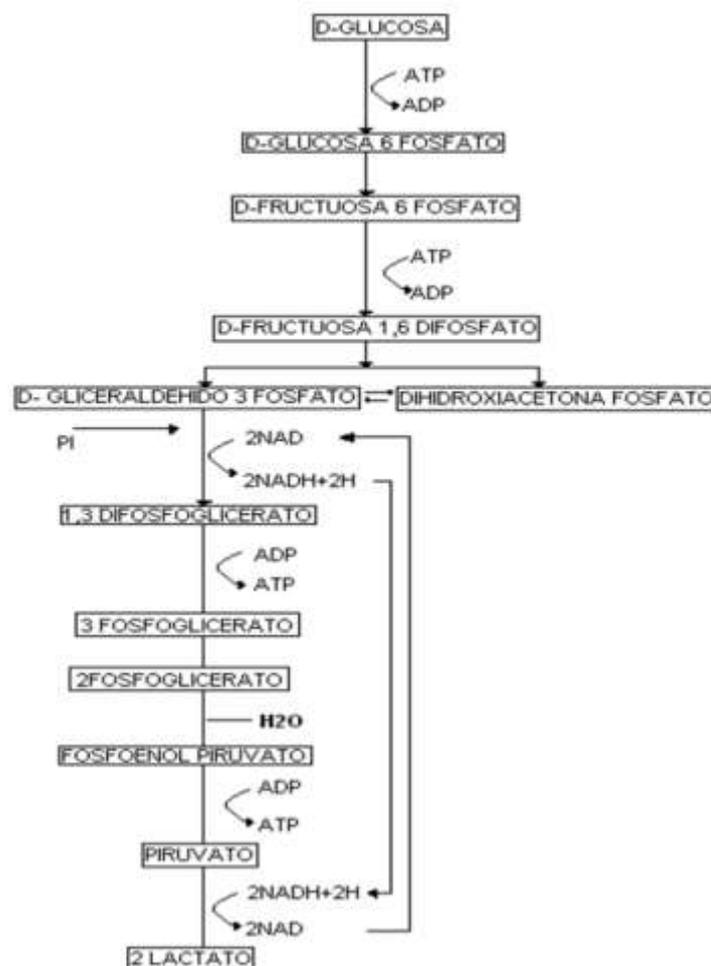


Figura 1. Ruta homofermentativa de las BAL(17).

BAL heterofermentativas.

Obtienen como producto final la producción de etanol y CO_2 en cantidades equimolares al ácido láctico sintetizado (Figura 2)(14), están conformadas por los géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*(16); los cuales utilizan la vía de la pentosa, esto debido a que presentan la enzima fosfoacetolasa y carecen de las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa(17).

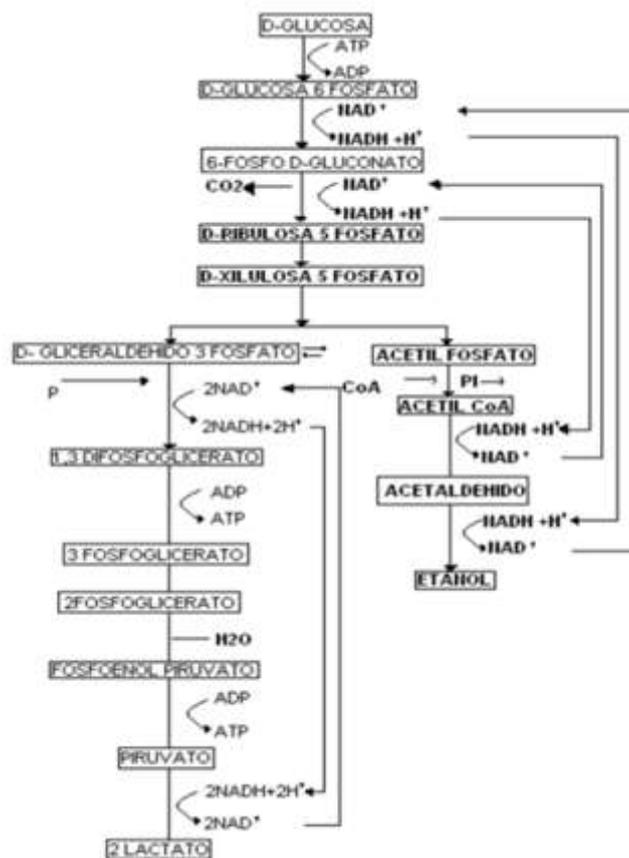


Figura 2. Ruta heterofermentativa de las BAL(17).

2.2.2. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos bioactivos que son sintetizados en el ribosoma de numerosas bacterias y son liberados extracelularmente. Las bacteriocinas matan o inhiben el crecimiento de células procariontas y potencialmente podrían ser útiles

contra los agentes patógenos y cepas bacterianas resistentes a antibióticos, esto debido a que su espectro de inhibición es relativamente estrecho y sus capacidades antimicrobianas son distintas a los que poseen los antibióticos de amplio espectro, lo que significa que se podrían utilizar para reemplazarlo(2).

La primera bacteriocina registrada es la colicina la cual proviene de la bacteria *Escherichia coli*, fue descubierta por el microbiólogo André Gratia en 1925 y la describió como una proteína con actividad antimicrobiana ; sin embargo, en cuanto a terminología no fue hasta el año 1953 en el que el biólogo Francois Jacob y su equipo de trabajo propusieron el término “bacteriocinas” para definir a las proteínas de origen bacteriano que manifiestan actividad antimicrobiana(18).

A pesar de que diversos microorganismos producen bacteriocinas las de mayor interés en la actualidad son las producidas por bacterias ácido lácticas debido a su seguridad, existen numerosas bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (ver Tabla 1) y cada una posee espectros de inhibición particulares contra microorganismos patógenos; también existen bacteriocinas usadas para la preservación de alimentos las cuales están aprobadas para su comercialización (ver Tabla 2)(1).

Tabla 1. Bacteriocinas producidas por distintos microorganismos

Bacteriocina	Clase	<i>Microorganismo productor</i>
Nisina	Ia	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
Epidermina	Ia	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Gallidermina	Ia	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
Lacticina	Ib	<i>Lactococcus lactis</i>
Citolisina	Ib	<i>Enterococcus faecalis</i>
Subtilosina A	Ic	<i>Bacillus subtilis</i>

Pediocina PA-1	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i>
Sakacina P	IIa	<i>Lactobacillus sake</i>
Lactococcina G	IIb	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i>
Plantaricina EF	IIb	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Plantaricina JK	IIb	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Divergicina A	IIc	<i>Carnobacterium divergens</i>
Enterocina AS-48	IIc	<i>Enterococcus faecalis</i>
Acidocina B	IIc	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Aureocina A53	IIId	<i>Staphylococcus aureus</i>
Aureocina A70	IIe	<i>Staphylococcus aureus</i>
Helveticina J	III	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Lactacina A	III	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Lactacina B	III	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Sublancina	IV	<i>Bacillus subtilis</i>
Glucocina F	IV	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Gasericina A	V	<i>Lactobacillus gasserii</i>

Tabla 2. Bacteriocinas aprobadas para ser comercializadas(1).

Bacteriocina	Nombre comercial	Aplicación industrial
Nisina A	Nisaplin™, E234	Conservante alimenticio.
	Biosafe™	Conservante de queso para prevenir malos olores.
	Oralpeace™	Producto para el cuidado bucal.
Pediocina PA-1	Microgard™, ALTA 2341	Conservante alimenticio
Sakacina	Bactoferm™ B-2,	Conservante cárnico
	Bactoferm™ B-FM	
Leucocina A	Bactoferm™ B-SF-43	Conservante cárnico

2.2.2.1. Clasificación de las bacteriocinas

Clase I. Son llamadas también lantibióticos, comprenden aminoácidos modificados y lantionina en su estructura, son de peso molecular pequeño (< 5 kDa) y son estables al calor; este grupo se subdivide en tres grupos más Clase Ia, Ib, Ic correspondientes a lantibióticos, laberín-toeptinas y sanctibióticos respectivamente. La bacteriocina que más destaca en este grupo es la nisina(19).

Clase Ia. Son péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana, presentan una estructura flexible y su masa oscila entre 2 a 4 kDa. En esta clase encontramos a la epidermina, nisina, gallidermina, etc(20).

Clase Ib. Son péptidos globulares e hidrófobos, las cuales se desenvuelven inhibiendo enzimas específicas que son primordiales para las bacterias patógenas, aquí encontramos a la lacticina, citolisina, etc(20).

Clase Ic. Poseen cisteína en su composición y son conocidas como Sactibióticos, a este grupo pertenece la subtilosina A(20).

Clase II. Son proteínas pequeñas (< 10 kDa) y termoestables, las cuales actúan a nivel de membrana citoplasmática, este grupo se subdivide en: IIa, IIb, IIc, IId, IIe(19).

Clase IIa. Es el subgrupo más extenso, los cuales poseen una secuencia consenso N-terminal TGNGVXC que ocasiona la pérdida del contenido celular de las bacterias afectadas al permeabilizar su pared, presentan alta especificidad en contra de cepas de *Listeria*. En este subgrupo encontramos a la pediocina PA-1 y la sakacina P(20).

Clase IIb. Son péptidos formadores de complejos que facilitan la formación de poros en la membrana de las bacterias afectadas, para esto necesitan dos péptidos diferentes.

Pertenece a este subgrupo Lactococcina G y las Plantaricinas EF y JK(20).

Clase IIc. En este grupo encontramos péptidos cíclicos, pequeños y termoestables que se movilizan mediante péptidos líderes, las regiones N-terminal y C-terminal de estos péptidos están unidas covalentemente. Pertenecen a este grupo la divergicina A, enterocina AS-48 y acidocina B(20).

Clase II d. Se caracterizan por ser bacteriocinas de un solo péptido, presentan alta tolerancia a la temperatura elevada y son estables a condiciones de acidez elevadas. La aureocina A53 es la bacteriocina más sobresaliente de este subgrupo(20).

Clase IIe. Están compuestas por tres o cuatro péptidos los cuales no presentan similitud a los de la pediocina. La bacteriocina reportada en este grupo es la aureocina A70, la cual ha demostrado inhibir el desarrollo de *Listeria monocytogenes*(20).

Clase III. Son bacteriocinas con un peso molecular mayor a 30 kDa, las cuales son termolábiles, las bacteriocinas que resaltan en esta clase son la helveticina J y las lactacinas A y B(19).

Clase IV. La cuarta clasificación abarca a bacteriocinas complejas, que tienen presentes restos de lípidos o carbohidratos los cuales son esenciales para su actividad biológica. En este grupo están la sublancina y la glucocina F(20).

Clase V. En la última clasificación se encuentran bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. Como integrante de este grupo está la gasicina A(15).

2.2.2.3. Mecanismo de acción de las bacteriocinas.

El mecanismo de acción de las bacteriocinas se basa principalmente en el aprovechamiento de su carga catiónica la cual interactúa con la carga aniónica de la superficie bacteriana de la célula diana que está compuesta por: fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, lipopolisacárido, ácido lipoteicoico y cardiolipina. Luego de que la carga positiva de las bacteriocinas interactúa electrostáticamente con la carga negativa de la bacteria, las superficies hidrofóbicas se alinean con la membrana y se produce la perforación de la bicapa lipídica, esto dará como consecuencia la formación de poros selectivos de iones, provocando así la disipación de la fuerza motriz del protón y el agotamiento del ATP intracelular, la fuga de sustratos intracelulares y finalmente la muerte de la célula(21).

El mecanismo de acción suele manifestarse con mayor efectividad en bacterias gram positivas que en las gram negativas ya que como plantea Grande *et al.*(22), las gram negativas presentan diez veces más resistencia en comparación con las gram positivas cuando se someten a bacteriocinas. Sin embargo, las bacteriocinas pueden ser combinadas con otros tratamientos antibacterianos como se muestra en la Figura 3, esto provocará un mejor resultado en cuanto a inhibición debido a la complementación que surge entre ellos debido a su mecanismo de acción distinto(23).

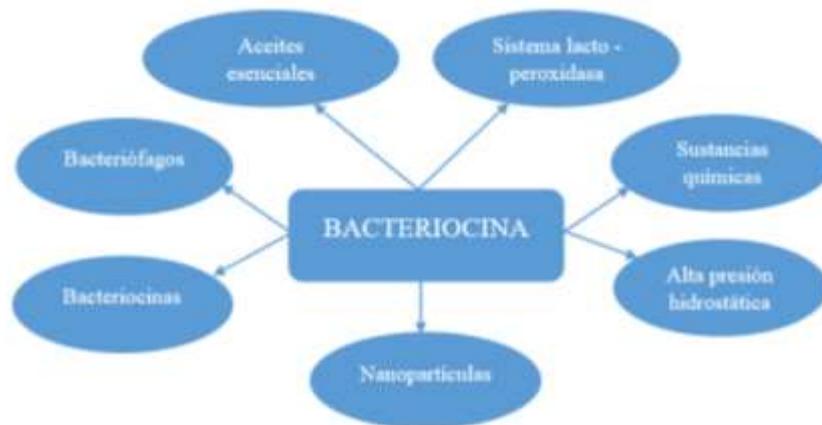


Figura 3. Bacteriocina y combinación con otros tratamientos(23).

2.2.2.4. Aplicaciones de las bacteriocinas.

Las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas tienen distintos usos debido a que su consumo no significa ningún riesgo para la población, en la actualidad se usa como: conservante alimenticio, agente terapéutico para uso médico y veterinario, fitosanitarios para la protección de las plantas, etc(19).

Conservante alimenticio. Este uso puede darse de dos formas: añadiendo directamente las bacteriocinas al alimento de interés o haciendo uso de un cultivo iniciador que irá añadido al alimento y el cual liberará las bacteriocinas deseadas para inhibir el deterioro y el desarrollo de bacterias patógenas. La bacteriocina más exitosa en este aspecto es la nisina purificada en cierto grado e incluso combinada con pediocina para potenciar su accionar(24).

Bacteriocinas en medicina humana. El uso de bacteriocinas en el ámbito de la salud humana viene a consecuencia del uso indiscriminado de antibióticos, los cuales eliminan las bacterias beneficiosas del intestino del humano y a consecuencia de ello se favorece

la proliferación de las bacterias patógenas, por lo cual el uso de las bacteriocinas fortalece la recuperación de las bacterias beneficiosas para las personas(19). En algunos casos se plantea a las bacteriocinas como un posible agente anticancerígeno o un agente que permita el diagnóstico de algún tipo de crecimiento canceroso(25).

Bacteriocinas en veterinaria. Su uso en veterinaria se relaciona principalmente con la inhibición del crecimiento de *Campylobacter* spp el cual es un patógeno que puede ser transmitido por productos avícolas. Se demostró en un experimento que la presencia de bacterias ácido lácticas en el intestino de las aves reducía el recuento de *Campylobacter* spp(26), además de que su adición en la comida de las aves evita la proliferación de hongos y en el caso de la comida para lechones favorece la asimilación de nutrientes(27).

2.2.3. *Salmonella* spp.

Salmonella spp es un microorganismo gram negativo, presente en forma de bacilo y su tamaño oscila entre 2 a 3 x 0,4 a 0,6 μm . Es el grupo más complejo de las enterobacterias, esto debido a su gran cantidad de serotipos, los cuales están determinados por los antígenos ya sean somáticos, flagelares o de superficie. Presentan un metabolismo oxidativo y fermentativo, produciendo ácido y gas durante la fermentación de glucosa, reducen nitratos a nitritos, producen ácido sulfhídrico, la mayoría son catalasa positivos y son ureasa negativos(28).

La infección alimentaria causada por *Salmonella* spp es conocida como salmonelosis, está relacionada con el consumo de productos alimenticios contaminados, principalmente los provenientes de aves y cerdos. Cuando se ingiere la dosis infectiva se produce la colonización del tracto intestinal provocando así el desarrollo del cuadro clínico(29). Los

síntomas de infección más comunes son la diarrea, fiebre y los calambres estomacales; estos se presentan de 6 a 72 horas luego de la ingesta de un alimento contaminado, siendo los niños y las personas inmuno comprometidas los más susceptibles a desarrollar un cuadro de infección severo(28).

Con respecto a los mecanismos de resistencia manifestados por *Salmonella* spp, estos puede lograrse mediante mutaciones en diferentes loci cromosómicos que conforman las islas genómicas, también puede lograrse a través de genes de resistencia exógenos que son transportados por elementos genéticos móviles; no obstante *Salmonella* spp manifiesta sus propios mecanismos de resistencia los cuales consisten en: la inactivación del fármaco mediante la modificación química del antimicrobiano o protegiendo el sitio objetivo del antibiótico el cual puede ser una enzima o una estructura celular específica; la reducción de la permeabilidad de su membrana, con lo que se impide el ingreso del fármaco, lo cual surge debido a los cambios producidos en las proteínas de la membrana, que conlleva a una alteración de los poros del sistema de transporte de membrana; y por último *Salmonella* spp ha desarrollado el mecanismo de bombear un fármaco que ya ingresó a su sistema(30).

2.2.4. *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus es una bacteria gram positiva, con un tamaño promedio entre 0,5 a 1,5 μm , es coagulasa positiva a diferencia de otras especies de *Staphylococcus*, además es catalasa positiva y el medio más usado para su cultivo es el agar Baird Parker (las colonias se visualizan de color negro a consecuencia de la reducción del telurito y un halo transparente debido a la acción lipolítica sobre la yema de huevo), también tiene como una de sus principales características su agrupación, debido a que se asemeja a racimos

de uvas(31).

Esta bacteria se ha convertido en uno de los principales microorganismos causantes de infecciones en el torrente circulatorio y de intoxicaciones causadas por alimentos. La mayor cantidad de brotes de intoxicación alimentaria son causados por *S. aureus* coagulasa positiva, debido a que producen enterotoxinas, las cuales tienen como característica ser termorresistentes. Los principales síntomas de una infección por *Staphylococcus* son: náuseas, dolor abdominal, emesis, diarrea, postración, en casos de mayor gravedad se manifiesta cefalea; sin embargo, la intensidad de los síntomas está relacionada con la cantidad de alimento contaminado que ha sido ingerido, la concentración de la toxina y la susceptibilidad del consumidor(32).

Uno de los aspectos más relevantes de *S. aureus* es su capacidad única para desarrollar rápidamente mecanismos de resistencia contra los antibióticos que comúnmente son utilizados para combatirla, pudiendo adquirir su resistencia mediante transferencia horizontal de plásmidos extracromosómicos, transposones u otros tipos de insertos de ácido desoxirribonucleico provenientes de otras especies bacterianas; o también mediante la mutación cromosómica de la misma bacteria. En cuanto a los plásmidos de resistencia a antibióticos, suelen contener genes que generan resistencia a antibióticos distintos a la vez. Ante esta problemática de la resistencia manifestada por algunas cepas de *S. aureus*, el uso de bacteriocinas es una alternativa natural para poder combatirlas(33).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

3.1. Nivel de Investigación

Explicativo

3.2. Tipo y diseño de estudio

Investigación Básica, diseño experimental

3.3. Marco muestral

3.3.1. Material biológico

Bacterias ácido lácticas aisladas de yogurt probiótico y aislamientos bacterianos de *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus* pertenecientes al Laboratorio de Microbiología/Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Cajamarca.

3.3.2. Unidad de estudio

Extractos crudos de bacteriocinas producidos por aislamientos de bacterias ácido lácticas.

3.4. Recolección de muestras

Se obtuvieron 9 muestras de yogurt probiótico comercial expendido en la ciudad de Cajamarca, para lo cual se tomaron como referencia tres tipos de presentaciones bebibles

y marcas de estos productos. Las muestras fueron almacenadas en un cooler que contenía gel pack para mantener las muestras a 4°C y así conservar la cadena de frío, las muestras fueron transportadas a las instalaciones del laboratorio BIOMIC S.R.L ubicado en la ciudad de Cajamarca, para su procesamiento. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta el momento de procesarlas.

3.5. Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Se preparó una solución madre con 90 mL de solución diluyente de peptona y 10 mL de yogurt probiótico, la cual se mantuvo en agitación manual por 5 minutos. Luego se tomó 1 mL de la solución madre y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 9 mL de solución diluyente de peptona y se realizaron diluciones hasta alcanzar la 10^{-6} . Se realizó la siembra por agotamiento en agar MRS de las dos últimas diluciones (10^{-5} y 10^{-6}) y se utilizó 1 mL de cada dilución. Las placas fueron llevadas a incubación de 24 a 48 horas a 35 °C en un ambiente microaerófilo, esto con ayuda de una jarra de anaerobiosis. Se evaluó el crecimiento bacteriano a las 24 y 48 horas procediendo a separar las colonias con características macroscópicas distintas, con la finalidad de obtener distintas especies de BAL, en viales con agar MRS, los cuales nuevamente fueron incubados de 24 a 48 horas a 35 °C en la jarra de anaerobiosis, a cada colonia se le asignó un código de identificación(4)(6).

3.6. Caracterización bioquímica de bacterias ácido lácticas

Las colonias aisladas en viales con agar MRS que no superaron las 24 horas de crecimiento fueron analizadas mediante pruebas bioquímicas para determinar si eran bacterias ácido lácticas, teniendo como referencia las características indicadas en el

Manual de Bergey's (ver Anexo 1), por lo cual fueron sometidas a coloración gram, coloración de esporas, prueba de catalasa, prueba de oxidasa, prueba de motilidad y prueba de Voges Proskauer(34).

Los resultados de las pruebas bioquímicas fueron detallados en la Ficha de aislamiento bacteriano (ver Apéndice 1) teniendo en cuenta el código de identificación asignado a cada colonia.

3.7. Identificación molecular de bacterias ácido lácticas mediante el gen 16S.

La identificación se realizó mediante el servicio de secuenciamiento ofrecido por Macrogen (Korea), el cual tiene como base el método de electroforesis capilar planteado por Sanger(35). Para esto se procedió a la reactivación de los aislamientos que en las pruebas bioquímicas demostraron tener características de bacterias ácido lácticas, esta reactivación se dio en viales que contenían agar MRS los cuales fueron incubados por 24 a 48 horas a 30 °C, pasado el tiempo de incubación se realizó la suspensión de las colonias en crioviales que contenían 0,3 mL de caldo BHI (20 %) y 1,2 mL glicerol (80 %), se colocó el código asignado a cada criovial y se selló con Parafilm, se realizó el envío a Macrogen y se hizo uso de la herramienta BLAST de NCIB para la identificación.

3.8. Evaluación de producción de proteínas mediante la reacción de Biuret

Se realizó la reacción de Biuret para cada aislamiento de BAL, para lo cual se cultivó cada aislado en tubos que contenían 10 mL de caldo MRS, se llevaron los tubos a incubación a 30 °C por 48 horas, pasado el tiempo de incubación se procedió a centrifugar cada tubo a 5000 rpm por 10 minutos, luego se pasó el sobrenadante a nuevos tubos con ayuda de jeringas estériles, el volumen transportado fue de 5 mL.

A cada tubo con sobrenadante se le agregó 500 μ L de NaOH al 10 % y consecutivamente se le añadieron 500 μ L de CuSO₄ al 1 %, se agitó levemente los tubos y se analizó el cambio de color para determinar si existía (color morado) o no (cualquier otro color) la presencia de proteínas extracelulares producidas por las bacterias ácido lácticas, se usó como blanco un tubo que solo contenía caldo MRS para descartar que la coloración haya sido producida por los componentes del medio(36).

3.9. Producción del extracto crudo de bacteriocinas.

La producción del extracto crudo de bacteriocinas se realizó en la Universidad Nacional de Trujillo en el Laboratorio de Tecnologías Limpias y o Emergentes, para lo cual se transportó los aislamientos en viales con medio MRS en un cooler con gel packs para mantener la temperatura en 4 °C. La reactivación de los aislamientos se realizó en matraces que contenían 10 mL de caldo MRS y se llevó a incubación a 35 °C por 24 horas, pasado el tiempo de incubación se realizó un control de pureza del aislamiento mediante la técnica de coloración Gram.

Para la preparación del inóculo necesario para la fermentación se determinó la absorbancia de la biomasa a una longitud de onda de 540 nm en el espectrofotómetro, primero se tomó como blanco el medio de fermentación puro el cual fue caldo MRS, consecuentemente se procedió a tomar una muestra del fermentado y se leyó su absorbancia esperando que esta fuera de 0,5; en los casos en los que la absorbancia fue mayor se procedió a diluir la muestra con suero fisiológico estéril hasta llegar a la absorbancia necesaria.

La fermentación se realizó en matraces de 250 mL los cuales contenían 50 mL de caldo MRS, se agregó en inóculo de cada aislamiento a cada matraz y se llevó a incubación en un shaker orbital a 30 °C y 150 rpm durante 48 horas, pasadas las horas de incubación se transfirió el fermentado a tubos de 50 mL, los cuales se centrifugaron a 4 °C y 10000 rpm durante 20 minutos. Realizada la centrifugación se procedió a filtrar el sobrenadante, para lo cual se hizo uso de jeringas estériles y de filtros de 0.22 µm de diámetro de poro, este procedimiento se realizó en la cabina de bioseguridad para evitar cualquier tipo de contaminación. El filtrado de cada aislamiento de bacteria ácido láctica se sometió a calentamiento a 80 °C durante 10 minutos en el baño maría, finalmente se ajustó el pH con NaOH 0,1M hasta llegar a 6,5(37)(38). Los tubos de 50 mL fueron transportados al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Cajamarca en un cooler a 4 °C y se conservaron en refrigeración hasta el momento de su análisis.

3.10. Sensibilidad a los antibióticos de los aislamientos de *S. aureus* y *Salmonella* spp

Se realizó la prueba de sensibilidad mediante antibiogramas teniendo como base la técnica descrita por Bauer *et. al*(39), para esto se hizo uso de placas Petri con medio Mueller Hinton, los cuales fueron inoculados con suspensiones bacterianas de cada aislamiento teniendo como referencia el tubo 0,5 de la escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ bacterias/ml). La inoculación se realizó por agotamiento con la ayuda de un hisopo estéril, luego se agregaron los discos correspondientes para cada aislamiento, para *S. aureus* se usaron: Eritromicina (E), Cefotaxima (CTX), Cloranfenicol (C), Gentamicina (CN), Amikacina (AK), Kanamicina (K) y Tetraciclina (TE); para *Salmonella* spp se usó: sulfametoxazol/trimetoprima (SXT), Cefoxitina (FOX), Tetraciclina (TE), Gentamicina (CN), Ciprofloxacino (CIP)(40); luego de que los discos fueron agregados se incubó por

24 horas a 35 °C, pasado el tiempo se realizó la medición de los halos.

3.11. Evaluación de la capacidad antibacteriana del extracto crudo de bacteriocinas

La evaluación se realizó mediante el método de difusión por disco planteada por Bauer *et.al*(39), para esto se reactivaron 3 aislamientos de *Salmonella* spp y 3 de *S. aureus* pertenecientes al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca, los aislamientos fueron sembrados en viales con agar nutritivo y llevados a incubación a 35 °C por 24 horas, pasado el tiempo de incubación se realizaron los inóculos, para esto se usaron tubos estériles los cuales contenían 3 mL de suero fisiológico estéril a los cuales se les fueron añadiendo colonias hasta llegar a la turbidez comparable con la del tubo 0,5 de la escala de Mc Farland, con el inóculo listo se realizó la siembra por agotamiento con un hisopo estéril en placas con medio Mueller Hinton. Con las placas listas se procedió a colocar los discos impregnados con 25 µL del extracto crudo de bacteriocinas (5 discos por placa, 1 disco para cada bacteriocina), las pruebas se realizaron por triplicado, las placas fueron llevadas a incubación por 24 horas a 35 °C, pasado el tiempo de incubación se realizó la medida de los halos formados para determinar la capacidad inhibitoria(38).

3.12. Procesamiento y análisis de datos

El análisis estadístico se realizó utilizando el Software Statistical Package for Social Sciences versión 22 (SPSS v.22) versión de prueba, se elaboró la base de datos con la cual se calcularon las medidas de tendencia central y los estadísticos descriptivos de los datos obtenidos durante la fase experimental, esto con el fin de tener los datos más

ordenados y facilitar los análisis posteriores, los resultados fueron sometidos a la prueba Shapiro-Wilk para determinar la normalidad, como los datos presentaron una normalidad absoluta se analizaron mediante la prueba paramétrica ANOVA con un nivel de confianza de 95 % y un $p < 0,05$, para establecer diferencias significativas entre los subgrupos establecidos (bacteriocinas y antibióticos).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Aislamiento de bacterias ácido lácticas

De las 9 muestras de yogurt probiótico procesadas se obtuvieron 11 aislamientos de bacterias gram positivas, las cuales fueron codificadas como: L₁Y₁, L₂(7), L₂(8), L₃(1), L₃(2), Bio₁, Bio₂, Bio₃, Bio₄, DL₁(1) y DL₁(2); y que posteriormente fueron sometidas a pruebas bioquímicas.

4.1.2. Caracterización bioquímica.

De los 11 aislamientos gram positivos, solo 5 fueron confirmados como bacterias ácido lácticas (ver Apéndice 3) con las pruebas realizadas; las primeras pruebas realizadas fueron la de catalasa y oxidasa, las cuales determinaron a qué aislamientos se les realizaría las siguientes pruebas; ya que los aislamientos que dieron positivo a catalasa y oxidasa fueron descartados para las demás pruebas (coloración de esporas, motilidad (SIM) y Voges Proskauer) Los resultados de las pruebas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de las pruebas de identificación para determinar bacterias ácido lácticas.

Código	Morfología	Prueba				
		Catalasa	Oxidasa	Coloración de esporas	Motilidad	Voges Proskauer
L ₁ Y ₁	Cocos	-	-	-	-	-
L ₂ (7)	Bacilos	+	+	*	*	*
L ₂ (8)	Bacilos	-	-	-	-	-

L ₃ (1)	Bacilos	+	+	*	*	*
L ₃ (2)	Bacilos	+	+	*	*	*
Bio ₁	Bacilos	+	+	*	*	*
Bio ₂	Bacilos	-	-	-	-	-
Bio ₃	Bacilos	+	+	*	*	*
Bio ₄	Cocos	-	-	-	-	-
DL ₁ (1)	Cocos	-	-	-	-	-
DL ₁ (2)	Bacilos	+	+	*	*	*

+ = positivo, - = negativo, * = no analizado

En cuanto a la morfología celular encontrada se identificaron 8 aislamientos de bacilos (72,7%) y 3 aislamientos de cocos (27,3%). Con respecto a las características para definirlos como BAL solo 2 (25%) fueron seleccionados en el caso de los bacilos y los 3 (100%) aislamientos en el caso de los cocos, tal y como se puede ver en la Tabla 4.

Tabla 4. Distribución de aislamientos en cuanto a morfología y características para BAL.

Morfología bacteriana	Aislamientos bacterianos	
	N.º de aislamientos (%)	N.º de aislamientos con características de BAL (%)
Bacilos	8(72,7)	2(25)
Cocos	3(27,3)	3(100)
Total	11(100)	5(45,5)

4.1.3. Identificación de bacterias ácido lácticas mediante el gen 16S ARNr

La Tabla 5, presenta las especies de bacterias ácido lácticas identificadas mediante el secuenciamiento en el que hizo uso de los primers universales 785F-907R y 27F-1492R. Entre las especies encontradas tenemos a: *Aerococcus viridans*, *Lacticaseibacillus*

rhamnosus, *Lactobacillus paracasei* y *Streptococcus thermophilus*; las cuales tuvieron un porcentaje de similitud mayor o igual al 99 %, tal y como indicó el reporte de MacroGen y la identificación realizada con la herramienta BLAST de NCBI (Apéndice 4).

Tabla 5. Identificación molecular de bacterias ácido lácticas mediante análisis del gen 16S ARNr.

Código	Familia	Género	Especie	Identidad (%)	Número de acceso
L ₁ Y ₁	<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Aerococcus viridans</i>	99	CP014164.1
L ₂ (8)	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lacticaseibacillus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	100	NR_113332.1
Bio ₂	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lacticaseibacillus</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99	LC065035.1
Bio ₄	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	99	NR_042778.1
DL ₁ (1)	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	99	NR_042778.1

4.1.4. Determinación cualitativa de proteínas

Los 5 aislamientos de bacterias ácido lácticas fueron sometidos a la prueba de Biuret, determinando que todos (100 %) eran productores de proteínas tal y como se puede observar en la Tabla 6, debido a que luego de la adición del NaOH al 10 % y del CuSO₄ al 1 % se observó una coloración morada, el cual es indicativo de la reacción positiva, en el caso del tubo que solo contenía caldo MRS se coloreó morado al inicio, sin embargo, con el pasar de los minutos el color se fue degradando hasta tornarse de un color anaranjado a comparación de los otros tubos que no cambiaron su coloración morada (ver Apéndice 5).

Tabla 6. Análisis cualitativo de proteínas mediante la reacción de Biuret.

Morfología bacteriana	Análisis cualitativo de proteínas	
	Produce proteínas (%)	No produce proteínas (%)
Bacilos	2(100)	0(0)
Cocos	3(100)	0(0)

4.1.5. Producción del extracto crudo de bacteriocinas

Se logró producir 50 mL de extracto crudo de bacteriocinas para cada aislamiento, los cuales se almacenaron en tubos de 50 mL estériles que se mantuvieron a 4 °C durante su traslado al laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca y hasta el momento de su uso contra los aislamientos de *Salmonella* spp y *S. aureus*.

4.1.6. Sensibilidad a los antibióticos de los aislamientos de *Salmonella* spp y *S. aureus*

En el caso de los aislamientos de *Salmonella* spp se hizo uso de sulfametoxazol/trimetoprima (SXT), Cefoxitina (FOX), Tetraciclina (TE), Gentamicina (CN), Ciprofloxacino (CIP) y se observó que los 3 aislamientos eran sensibles a los antibióticos utilizados, el tamaño de los halos de inhibición obtenidos está detallados en la Tabla 7 y para su interpretación se tomó como referencia las Normas CLSI-NCCLS del año 2020(41) (ver Anexo 2).

Tabla 7. Resultados de las pruebas de sensibilidad de los aislamientos de *Salmonella* spp

Aislamiento	Antibiótico (halo en milímetros)				
	SXT	FOX	TE	CN	CIP
<i>Salmonella</i> spp 1	25(S)	25(S)	22(S)	16(S)	30(S)
<i>Salmonella</i> spp 2	21(S)	26(S)	21(S)	20(S)	34(S)
<i>Salmonella</i> spp 3	21(S)	23(S)	21(S)	19(S)	32(S)

R = resistente, SM = sensibilidad media, S = sensible

Con respecto a los aislamientos de *S. aureus* se usó Eritromicina (E), Cefotaxima (CTX), Cloranfenicol (C), Gentamicina (CN), Amikacina (AK), Kanamicina (K) y Tetraciclina (TE), observándose que los aislamientos 125 y 134 eran sensibles a todos los antibióticos usados a comparación del aislamiento 184 que presenta una sensibilidad media con respecto a Gentamicina y es resistente tanto a Eritromicina, Amikacina y Kanamicina; los resultados obtenidos están plasmados en la Tabla 8 y para su interpretación se tomó como referencia las Normas CLSI-NCCLS del año 2020(41) (ver Anexo 3).

Tabla 8. Resultados de las pruebas de sensibilidad de los aislamientos de *Staphylococcus aureus*

Aislamiento	Antibiótico (halo en milímetros)						
	E	CTX	C	CN	AK	K	TE
<i>Staphylococcus aureus</i> 125	23(S)	26(S)	23(S)	20(S)	22(S)	20(S)	24(S)
<i>Staphylococcus aureus</i> 134	24(S)	27(S)	22(S)	19(S)	20(S)	19(S)	25(S)
<i>Staphylococcus aureus</i> 184	9(R)	29(S)	25(S)	13(SM)	10(R)	12(R)	24(S)

R = resistente, SM = sensibilidad media, S = sensible

4.1.6. Evaluación de la capacidad antibacteriana del extracto crudo de bacteriocina

El método desarrollado para determinar la capacidad antibacteriana fue el de difusión por disco y los resultados obtenidos pueden visualizarse en la Tabla 9 en el caso de los aislamientos de *Salmonella* spp y en la Tabla 10 para los aislamientos de *S. aureus*, la capacidad inhibitoria del crecimiento del extracto crudo de bacteriocinas fue determinada teniendo como base la escala de Duraffourd (ver Anexo 4).

Con los aislamientos de *Salmonella* spp se observó que el 1 fue sensible a los extractos crudos de bacteriocinas de L₁Y₁, L₂(8) y DL₁(1); el aislamiento *Salmonella* spp 2 presentó sensibilidad frente a los extractos L₁Y₁, Bio₂, Bio₄ y DL₁(1); y el aislamiento de *Salmonella* spp 3 no presentó sensibilidad contra los extractos usados (ver Apéndice 6).

Tabla 9. Capacidad inhibitoria del extracto crudo de bacteriocinas frente a los aislamientos de *Salmonella* spp.

Extracto crudo de bacteriocina	Halo de inhibición en milímetros											
	<i>Salmonella</i> spp 1				<i>Salmonella</i> spp 2				<i>Salmonella</i> spp 3			
	1° rep	2° rep	3° rep	Media (milímetros)	1° rep	2° rep	3° rep	Media (milímetros)	1° rep	2° rep	3° rep	Media (milímetros)
L ₁ Y ₁	9	8	8,5	8,5(+)	9	8,5	8,7	8,7(+)	7,8	8	7,5	7,8(-)
L ₂ (8)	8,3	8	8,2	8,2(+)	8,3	8	7,5	7,9(-)	7,8	7,5	7,3	7,5(-)
Bio ₂	8	7,8	7,5	7,8(-)	9,5	7,3	9,2	8,7(+)	8	7	7	7,3(-)
Bio ₄	8,5	7,8	7,5	7,9(-)	9	9,2	7	8,4(+)	7,7	7	7,3	7,3(-)
DL ₁ (1)	8	8	8,5	8,2(+)	8,3	8,8	8,5	8,5(+)	8	7,7	8,3	8(-)

- = nula, + = sensible, ++ = muy sensible, +++ = sumamente sensible

En el caso de los aislamientos de *S. aureus* se observó que el 125 fue sensible contra el extracto crudo de bacteriocinas de los aislamientos L₂(8), Bio₂ y DL₁(1); el aislamiento 134 presentó sensibilidad contra los extractos de L₁Y₁, L₂(8), Bio₂ y Bio₄; y el aislamiento 184 fue sensible contra el extracto de L₁Y₁, L₂(8), Bio₂ (ver Apéndice 6).

Tabla 10. Capacidad inhibitoria del extracto crudo de bacteriocinas frente a los aislamientos de *S. aureus*

Extracto crudo de bacteriocina	Halo de inhibición en mm											
	<i>Staphylococcus aureus</i> 125				<i>Staphylococcus aureus</i> 134				<i>Staphylococcus aureus</i> 184			
	1° rep	2° rep	3° rep	Media (milímetros)	1° rep	2° rep	3° rep	Media (milímetros)	1° rep	2° rep	3° rep	Media (milímetros)
L ₁ Y ₁	7,5	7,8	7,5	7,6(-)	9,5	9	9,5	9,3(+)	12,3	11	11,5	11,6(+)
L ₂ (8)	8,8	9,3	9	9(+)	11,2	10	9,3	10,2(+)	7,7	8,7	8,3	8,2(+)
Bio ₂	8	11,3	9,5	9,6(+)	9,3	8,5	8,3	8,7(+)	7,2	10	8,5	8,6(+)
Bio ₄	7,8	7,5	7,5	7,6(-)	8	8	8,3	8,1(+)	7	7,3	7	7,1(-)
DL ₁ (1)	9	7,5	8	8,2(+)	7	8,6	8	7,9(-)	7,8	8	8	7,9(-)

- = nula, + = sensible, ++ = muy sensible, +++ = sumamente sensible

4.1.7. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos (ver Apéndice 7 y 8), se evaluó el perfil de sensibilidad de cada extracto crudo de bacteriocinas contra los aislamientos de *Salmonella* spp y *S. aureus*, teniendo como base los diámetros de la escala de Duraffourd, obteniendo como resultados que los extractos de los aislamientos L₁Y₁, L₂(8) y Bio₂ presentan un porcentaje de inhibición mayor el cual fue de 66,7% en comparación con los extractos de los aislamientos Bio₄ y DL₁(1) los cuales obtuvieron porcentajes de 33,3% y 50% respectivamente (ver Apéndice 9).

Luego se realizó la prueba de normalidad con los datos obtenidos de las bacteriocinas y de los antibióticos gentamicina y tetraciclina, dando como resultado que todos los datos tenían una significancia mayor a 0,05 ($p < 0,05$) (ver Apéndice 10), siguiendo por consecuencia una distribución normal y por tanto pudieron ser analizados usando una prueba paramétrica. Posteriormente, se utilizó la prueba paramétrica ANOVA para establecer diferencias significativas entre los tratamientos: bacteriocinas (L₁Y₁, L₂(8)

Bio₂, Bio₄ y DL₁(1)) y antibióticos (Gentamicina y Tetraciclina), dando como resultado que existe diferencia significativa, debido a que el *p valor* fue menor a 0,05 (ver Apéndice 11), por tal motivo se procedió a realizar la prueba de Levene (ver Apéndice 12) para homogenización de varianzas, pudiendo así determinar la prueba post hoc a utilizar, siendo esta la prueba T3 de Dunnet (ver Apéndice 13 y 14), la cual determinó qué tratamientos se comportan igual entre sí y entre cuales existe diferencia significativa.

Determinando así que entre las bacteriocinas el comportamiento es igual, sin embargo, el comportamiento difiere en cuanto al presentado por los antibióticos utilizados. No obstante, aunque los tratamientos no tienen el mismo comportamiento, por los datos obtenidos se evidencia que ambos poseen efecto inhibitorio del crecimiento contra *Salmonella* spp y *S. aureus*.

4.2. Discusión.

En cuanto a la obtención de los 5 aislamientos de bacterias ácido lácticas, uno de los puntos más importantes es el uso del medio MRS, el cual es un medio selectivo para estas bacterias, ya que la peptona, extracto de carne, extracto de levadura y glucosa son la fuente nutritiva del medio y la presencia del citrato de amonio inhibe el crecimiento de bacterias gram negativas, tal y como lo manifiesta Carolina Ramírez y Jorge Vélez(4), los cuales lograron aislar 18 cepas de bacterias ácido lácticas haciendo uso de este medio selectivo. Con respecto a la Tabla 3 en la que se muestra los resultados de la caracterización bioquímica, se pudo observar que del total de aislamientos presuntivos para bacterias ácido lácticas solo el 45,5 % demostraron cumplir todos los requisitos establecidos, lo cual muestra una similitud a lo obtenido por Rivera de la Cruz *et al.*(7), debido a que en su trabajo de los 55 aislamientos presuntivos para bacterias ácido lácticas

solo 31 (56,4 %) fueron consideradas finalmente como BAL. En cuanto a la morfología de los aislamientos descrita en la Tabla 4, los resultados concuerdan con lo obtenido por Bryan Leal y Claudia Amorocho(6), quienes aislaron bacilos y cocos en muestras de yogurt comercial; al igual que López *et al.*(12), los cuales evaluaron lotes de yogurt comercial encontrado una mayor presencia de BAL que morfológicamente eran cocos (7,58 UFC/g) en comparación con las BAL que eran bacilos (6,79 UFC/g).

La identificación molecular mediante el análisis del gen 16S ARNr se realizó con el fin de conocer a certeza que especies de BAL se lograron aislar del yogurt probiótico, las especies encontradas pueden ser visualizadas en la Tabla 5; en cuanto a las BAL *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* y *Streptococcus thermophilus*, su presencia concuerda con la descripción brindada en los yogures probióticos usados en esta investigación, además de que su uso se sustenta debido a su gran potencial probiótico o como en el caso de *S. thermophilus* a su labor como cultivo iniciador en la producción de yogur o de otros productos lácteos fermentados(42). En cuanto a la presencia de *Aerococcus viridans* es una BAL inusual, ya que es un microorganismo saprofito el cual se asocia principalmente a ambientes con presencia de polvo, sin embargo, también fue encontrado en muestras de yogurt en la investigación realizada por *Lamye Glory et al.*(43).

La determinación cualitativa de la producción de proteínas por las BAL se realizó con la finalidad de determinar la presencia de proteínas secretadas extracelularmente por cada aislamiento, lo cual es un indicio de la producción de bacteriocinas. Lográndose como resultado que todos los aislamientos dieron positivo a la determinación cualitativa de proteínas mediante la reacción de Biuret, tal y como obtuvieron Cuellar Guevara(36) y

Gastaldi Elizondo(44) en sus trabajos de investigación, en los cuales usaron cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*, obteniendo una coloración morada en cada uno de los dializados de los extractos de bacteriocinas que lograron producir, determinando así cualitativamente la presencia de proteínas.

Para la producción de bacteriocinas se tomó como parámetros de productividad una temperatura de incubación de 30 °C y 150 rpm en un shaker orbital por 48 horas y un pH del medio MRS broth de 6,5; lo cual concuerda con lo establecido por Soma *et al.*(9), quienes indicaron que la producción máxima de bacteriocinas ocurría en un pH de 5 a 7, a una temperatura de 30 °C y en agitación constante; esto último con el fin de mejorar el intercambio gaseoso, que el medio se mantenga homogenizado para evitar la precipitación de la biomasa; para aumentar la producción de biomasa y por consiguiente la producción del metabolito de interés en este caso las bacteriocinas. Además, se realizó la inactivación de los metabolitos que no eran de interés para así poder analizar únicamente el potencial antimicrobiano de las bacteriocinas, en este sentido al usar el filtro de 0,22 µm se eliminaron las células restantes en el sobrenadante, con el estrés térmico se inactivaron las enzimas proteolíticas(37) y al neutralizar el sobrenadante con NaOH se neutralizaron los ácidos orgánicos(45).

Los aislamientos de *Salmonella* spp y *S. aureus* usados en esta investigación fueron sometidos a la prueba de sensibilidad con el fin de conocer la susceptibilidad de estos microorganismos a los antibióticos que comúnmente son utilizados para combatirlos, la elección de los antibióticos se realizó teniendo en cuenta la clasificación brindada por Bernal R. y Guzman U.(40), quienes detallaron que antibióticos eran efectivos contra gram positivos y cuales contra gram negativos; además, para la determinación de los

“breakpoints” de cada antibiótico se tuvo como referencia lo estipulado en las Normas CLSI-NCCLS del año 2020, pudiendo así determinar si es que alguno de los aislamientos presentaba resistencia o era sensible a los antibióticos utilizados tal y como se observa en la Tabla 7 y 8. Como solo dos de los antibióticos empleados (Gentamicina y Tetraciclina) eran comunes tanto para *Salmonella* spp como para *Staphylococcus aureus*, fueron seleccionados para ser tratamientos y por ende poder comparar su accionar con el de los extractos crudos de bacteriocinas.

Para el análisis de la capacidad antibacteriana de los extractos crudos de bacteriocinas de las BAL encontradas contra los aislamientos de *Salmonella* spp y *S. aureus*, se realizó un enfrentamiento directo mediante la técnica de difusión por disco, para esto se utilizó 25 µL de extracto, el cual fue impregnado en los discos utilizados, la cantidad de microlitros usados es la misma que fue utilizada por López T. *et al.*(12), en cada uno de los tres procedimientos que desarrollo para evaluar el efecto inhibitorio de sus BAL aisladas contra *S. aureus* y *Escherichia coli*; además el uso de una sola cantidad de microlitros se estableció teniendo como base lo manifestado por Soares Vitola *et al.*(8), quienes al evaluar distintas concentraciones de nisina y pediocina determinaron que no existe un diferencia significativa en cuanto a la capacidad antibacteriana que manifiestan.

Con lo concerniente al tamaño de halo producido por los extractos para ser considerado como inhibidor del crecimiento de los aislamientos de *Salmonella* spp y *S. aureus* se tuvo como referencia a la escala de Duraffourd, la cual permite determinar el efecto inhibitorio in vitro de manera cualitativa, según el tamaño del halo de inhibición manifestado(46); no obstante, también se tuvo como criterio lo planteado por Soma *et al.*(9), quienes hicieron uso de la cepa indicadora *Enterococcus faecalis*, enfrentándola contra el extracto

crudo de bacteriocinas producido por aislamientos de *Lactococcus lactis*, clasificando como efectivos los extractos que producían un halo de inhibición ≥ 8 mm. Teniendo esto en cuenta se realizó la clasificación observada en la Tabla 9 y 10; además, se puede apreciar en dichas tablas que el tamaño de los halos producidos contra *S. aureus* es mayor al tamaño de los halos producidos contra *Salmonella* spp, teniendo esto que ver con la clasificación Gram de dichas bacterias ya que como manifiesta Cortés Duque *et al.*(10) la interacción de las bacteriocinas disminuye cuando se acoplan a la bicapa de bacterias gram negativas a comparación de las gram positivas que cuentan únicamente con una capa.

En la Tabla 9 se puede observar que cada extracto de bacteriocinas inhibió al menos a un aislamiento de *Salmonella* spp, obteniendo así que todos los aislamientos de BAL de yogurt probiótico tienen efecto inhibitorio contra esta bacteria patógena, lo cual difiere a lo hallado por Rivera de la Cruz *et al.*(7) quienes determinaron que de sus 55 BAL aisladas solo el 9,6 % produjo un sobrenadante que inhibía considerablemente el crecimiento de *Salmonella enterica var. typhimurium*, también discrepa con los datos obtenidos por Cortés Duque *et al.*(10) los cuales no lograron encontrar un extracto de BAL que inhibiera el crecimiento de *Salmonella* spp en 98 aislamientos; sin embargo, ambos reportan que una caída en el pH de los sobrenadantes y extractos crudos elevaría el efecto inhibitorio contra cepas de *Salmonella*. No obstante, los resultados obtenidos concuerdan con Akbar Ali *et al.*(11) ya que en su estudio que tenía como fin determinar el potencial bacteriocinogénico de BAL obtuvo halos de inhibición de hasta 11,2 mm contra las cepas de *Salmonella typhimurium*.

En lo plasmado en la Tabla 10 con respecto al accionar de los extractos crudos de bacteriocinas contra los aislamientos de *S. aureus*, se puede evidenciar que todos los extractos de las BAL inhibieron el crecimiento de la bacteria gram positiva, lo cual se asemeja a lo hallado por Soares Vitola *et al.*(8), ya que al evaluar dos tipos de bacteriocinas (nisina y pediocina), lograr determinar que la nisina inhibía el crecimiento de *S. aureus* de manera considerable a comparación de la pediocina que no tuvo efecto alguno; lo cual deja en evidencia el espectro reducido de inhibición que poseen las bacteriocinas; en lo reportado por Akbar Ali *et al.*(11), se ratifica el accionar de los extractos de BAL sobre *S. aureus*, ya que logró obtener halos de inhibición sumamente amplios (21,2 mm); además en cuanto a la comparativa con la inhibición de las bacterias gram negativas que usó, se logra observar la diferencia en el tamaño de los halos, tal y como sucedió en el presente estudio, obteniendo halos de mayor medida con la bacteria gram positiva (11,6 mm) en comparación con la gram negativa (8,7 mm).

En el análisis estadístico se realizó en primer lugar la determinación de los estadísticos descriptivos, esto con el fin de resumir y ordenar los datos obtenidos de manera más efectiva y simple de analizar, luego se determinó el perfil de sensibilidad de cada extracto crudo de bacteriocinas, esto con el fin de determinar cuáles BAL producían un extracto de bacteriocinas más efectivo contra los aislamientos patógenos, encontrando así en un comparativa general que los extractos de *Aerococcus viridans*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* y *Lactobacillus paracasei* inhibieron en más ocasiones a las bacterias estudiadas (66,7 %); en comparación con los extractos de bacteriocinas de los dos aislamientos de *Streptococcus thermophilus*, los cuales inhibieron en menos ocasiones a las bacterias patógenas (50 % y 33,3 %).

Posteriormente, con los datos ordenados se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, dicha prueba de normalidad fue seleccionada debido a que la cantidad de datos era menor a 50, obteniendo que los datos tenían una tendencia normal ya que el valor de significancia fue mayor a 0,05; con esto como resultado se pudo optar por la prueba paramétrica ANOVA, con la cuál se comparó el comportamiento de los tratamientos (bacteriocinas y antibióticos), obtenido un p valor menor a 0,05; determinando así que existe diferencia significativa en cuanto a su accionar, por tal motivo se realizó la prueba de Levene, la cual dio como resultados que los datos poseían varianzas distintas, por tal motivo se realizó análisis T3 de Dunnet, el cual agrupo a los tratamientos en dos subgrupos: las bacteriocinas que no manifiestan diferencias significativas entre sí y los antibióticos los cuales entre si se comportan igual pero se observan diferencias significativas en cuanto a su accionar comparado al de las bacteriocinas, tal y como se muestra en la Tabla 11. Esta diferencia en el comportamiento recae principalmente en el diámetro de los halos de inhibición producidos, ya que el de los antibióticos es mucho más amplio, sin embargo, a pesar de está diferencia, ambos tratamientos demostraron tener la capacidad inhibitoria del crecimiento contra *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus*, ya que para determinar la capacidad de las bacteriocinas se usó la escala de Duraffourd y para los antibióticos los breakpoints establecidos por el CLSI.

Estos resultados obtenidos dejan un precedente en cuanto a la investigación de bacteriocinas que se han desarrollado en nuestra región ya que se pudo corroborar su capacidad antibacteriana, si bien solo se evaluó el extracto crudo sin llegar a purificar, se puede inferir cuales fueron las bacteriocinas que estuvieron implicadas en la inhibición del crecimiento de *Salmonella* spp y *S. aureus*, esto debido a que se determinó mediante secuenciamiento las especies aisladas; ya que tal y como reportan investigadores como:

Ballester J. *et al.*(47) en el caso de *Aerococcus viridans*, es capaz de producir la bacteriocina llamada viridicina; Capurso L.(48), en su revisión sobre *Lactocaseibacillus rhamnosus* indica que esta bacteria produce la microcina; en cuanto a *Lactobacillus paracasei* produce la “Bacteriocina 217” tal y como informa Jelena Lozo *et al.*(49) y finalmente *Streptococcus thermophilus* que produce la bacteriocina llamada termofilinas reportas por Ramya Iyer *et al.*(42) en su compilación sobre el papel multifuncional de esta bacteria. Todos estos autores manifiestan el efecto inhibitorio que poseen estas bacteriocinas contra bacterias gram negativas y gram positivas lo cual guarda total relación con lo hallado en este trabajo.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Se determinó que las bacteriocinas producidas por los 5 aislamientos de bacterias ácido lácticas provenientes de yogurt probiótico inhiben el crecimiento de los aislamientos de *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus*.

Se caracterizó bioquímica y molecularmente a las bacterias ácido lácticas aisladas, se comprobó la presencia de *Aerococcus viridans*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* y dos aislamientos de *Streptococcus thermophilus*.

Se determinó que los aislamientos L₁Y₁ (*Aerococcus viridans*), L₂(8) (*Lacticaseibacillus rhamnosus*), Bio₂ (*Lactobacillus paracasei*); presentaron un porcentaje de inhibición de 66,7% y los aislamientos Bio₄ (*Streptococcus thermophilus*) y DL₁(1) (*Streptococcus thermophilus*) un porcentaje de inhibición de 33,3% y 50% respectivamente.

La prueba de ANOVA mostró evidencia de que existe diferencia significativa en cuanto al comportamiento de las bacteriocinas y los antibióticos Gentamicina y Tetraciclina, sin embargo, a pesar de presentar esta diferencia, por los datos obtenidos se comprobó que ambos inhiben el crecimiento de *Salmonella* spp y *S. aureus*.

5.2. RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones independientes con cada bacteria ácido láctica aislada y con su bacteriocina, esto con el fin de poder optimizar la producción pudiendo así purificarla y cuantificarla, ya que individualmente sería mucho más factible debido a los altos costos y equipos especializados que requieren estas pruebas.

También se pueden realizar estudios en cuanto a la capacidad como conservante alimenticio que poseen las bacteriocinas, teniendo en cuenta que nuestra región comercializa muchos productos lácteos y esto podría darle un valor agregado.

LISTA DE REFERENCIAS

1. Daba GM, Elkhateeb WA. Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2020;28:101750.
2. Zou J, Jiang H, Cheng H, Fang J, Huang G. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *Int J Biol Macromol.* 2018;117(2017):781–9.
3. Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol.* 2018;49:23–8.
4. Vélez J, Ramírez C. Aislamiento , Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. *Inf Tecnológica.* 2016;27(6):115–28.
5. Yi L, Dang Y, Wu J, Zhang L, Liu X, Liu B, et al. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus crustorum* MN047 isolated from koumiss from Xinjiang , China. *J Dairy Sci.* 2016;99(9):7002–15.
6. Leal B, Milena C, Cruz A. Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias lácticas aisladas de productos lácteos comerciales frente a *Escherichia coli*. *Ing y Región.* 2017;18(2):45–52.
7. Rivera de la Cruz JF, Villegas de Gante A, Miranda Romero LA, García Cué JL. Identificación de bacterias acidolácticas antagónicas de *Salmonella enterica* var. *Typhimurium* aisladas de queso artesanal. *Rev Mex Ciencias Agrícolas.* 2017;8(4):785–97.
8. Helena Reissig Soares Vitola;, Eliezer Ávila Gandra;, Ana Paula Guedes Frazzon;, Guilherme da Silva Dannenberg;, Amanda de Souza da Motta. Efeito de nisina e pediocina sobre culturas de *Staphylococcus aureus* isoladas de carcaças de frango. *Brazilian J Biosci.* 2018;16:21–7.

9. Barman S, Ghosh R, Mandal NC. Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. *Ann Agrar Sci.* 2018;16(3):286–96.
10. Cortés Duque JC, Mejía Rivera LF, Oyola Vanegas YF. Evaluación del efecto inhibitorio de extractos obtenidos de bacterias ácido lácticas (BAL) frente al crecimiento de *Salmonella* spp. Universidad Libre Seccional Pereira; 2018.
11. Akbar A, Sadiq MB, Ali I, Anwar M, Muhammad N, Muhammad J, et al. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from fermented milk products and its antimicrobial potential. *CYTA - J Food.* 2019;17(1):214–20.
12. López T, Parra Y, Fernández D, Álvarez S, Ayala C, Policani M, et al. Growth inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by lactic acid bacteria isolated from raw milk and Paraguay cheese. *Reportes científicos la FACEN.* 2021;12(1):3–9.
13. Freire TT, Silva ALT e, Ferreira BKO, Santos TM dos. Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. *Res Soc Dev.* 2021;10(11):e513101119964.
14. Gorbeña JCR, Sáenz TA. Bacterias ácido lácticas. *Biotempo.* 2017;8(0):54–64.
15. Monroy C, Castro T, Fernández J, Mayorga L. Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS.* 2009;73(NOVEMBER):63–72.
16. Malma Ruiz LM. Proceso Homofermentativo De Kéfir Con Bacterias Probióticas Típicas Para Prolongar Su Tiempo De Vida Útil. Universidad Nacional del Callao. 2021.
17. Parra Huertas RA. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Fac Ciencias Agropecu.* 2010;8(1):93–105.
18. Catagña Rodríguez RP. Revisión bibliográfica sobre las bacteriocinas y su

aplicación como bioconservante dentro de la industria alimentaria. UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO; 2021.

19. Timothy B, Iliyasu AH, Anvikar AR. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria and Their Industrial Application. *Curr Top Lact Acid Bact Probiotics*. 2021;7(1):1–13.
20. Cañaverl I, Chalarca J, Gaviria D. Bacteriocinas: Visión Básica Y Aplicada. *Aliment Cienc e Ing*. 2020;27(2):7–33.
21. Kumariya R, Garsa AK, Rajput YS, Sood SK, Akhtar N, Patel S. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microb Pathog*. 2019;128:171–7.
22. Burgos MJG, Pulido RP, Aguayo M del CL, Gálvez A, Lucas R. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: Isolation, mode of action, and possible food applications. *Int J Mol Sci*. 2014;15(12):22706–27.
23. Castellanos-Rozo J, Galvis-lópez JA, Pérez R. Las bacteriocinas y su efecto sinérgico con tecnologías emergentes en alimentos. *Mutis*. 2022;12(2).
24. Silva CCG, Silva SPM, Ribeiro SC. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Front Microbiol*. 2018;9(APR).
25. A P, L D, I M, S S, O B, S I, et al. Antioxidant, antimicrobial and antitumor activity of bacteria of the genus *Bifidobacterium*, selected from the gastrointestinal tract of human. *Integr Mol Med*. 2015;2(5).
26. Arsi K, Donoghue AM, Woo-Ming A, Blore PJ, Donoghue DJ. The efficacy of selected probiotic and prebiotic combinations in reducing *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *J Appl Poult Res*. 2015;24(3):327–34.
27. Dowarah R, Verma AK, Agarwal N, Singh P, Singh BR. Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PLoS One*.

- 2018;13(3).
28. Parra M, Durango J, Máttar S. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. *Mvz.* 2015;7(2):187–200.
 29. Ehuwa O, Jaiswal AK, Jaiswal S. Salmonella, food safety and food handling practices. *Foods.* 2021;10(5):1–16.
 30. Castro-Vargas RE, Herrera-Sánchez MP, Rodríguez-Hernández R, Rondón-Barragán IS. Antibiotic resistance in Salmonella spp. isolated from poultry: A global overview. *Vet World.* 2020;13(10):2070–84.
 31. Pasachova J, Ramirez S, Muñoz L. Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova.* 2019;17(32):25–38.
 32. Zendejas G, Avalos H, Soto M. Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades de patogenicidad, métodos de identificación. *Rev Biomed.* 2014;25(3):129–43.
 33. Al-Mebairik NF, El-Kersh TA, Al-Sheikh YA, Marie MAM. A review of virulence factors, pathogenesis, and antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. *Rev Res Med Microbiol.* 2016;27(2):50–6.
 34. Landa Salgado P, Caballero Cervantes Y, Ramirez Bribiesca E, Hernández Anguiano A, Ramirez Hernández L, Espinosa Victoria D, et al. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico para becerros del altiplano mexicano. *Rev Mex Ciencias Pecu.* 2019;1:68–83.
 35. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463–7.
 36. Cuellar Guevara F. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BACTERIOCINAS SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE Entamoeba histolytica HM1 IMSS Y

CARACTERÍSTICAS NANOMECAÑICAS DE LA SUPERFICIE CELULAR AL MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2015.

37. Zapata S, Muñoz J, Ruiz O, Montoya O, Gutiérrez P. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae*. 2009;16(63):75–82.
38. Vásquez M S, Suárez M H, Inés Montoya O. Evaluación de bacteriocinas como medio protector para la biopreservación de la carne bajo refrigeración. 2009;36:228–38.
39. Bauer A W, Kirby W M, Sherris M D, Turck M D. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45(4):17–47.
40. Bernal R. M, Guzmán M. El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*. 1984;4(3–4):112.
41. CLSI. CLSI M100-ED29: 2021 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition. Vol. 40, Clsi. 2020. 50–51 p.
42. Iyer R, Tomar SK, Uma Maheswari T, Singh R. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *Int Dairy J*. 2010;20(3):133–41.
43. Moh LG, Etienne PT, Jules-Roger K. Seasonal Diversity of Lactic Acid Bacteria in Artisanal Yoghurt and Their Antibiotic Susceptibility Pattern. *Int J Food Sci*. 2021;2021.
44. Gastaldi Elizondo CD. Obtención y caracterización de posbióticos de *Lactobacillus* sp. / *Bifidobacterium longum* y su evaluación sobre carcinoma murino. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN; 2021.
45. Cristóbal Delgado RL. Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias. Universidad Nacional

Mayor De San Marcos Facultad De Farmacia Y Bioquimica. 2008.

46. García Rubio KM. EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Cinnamomum Zeylanicum* (CANELA) SOBRE EL *Fusobacterium Nucleatum* ATCC 25586. Vol. 4, Lexus. Universidad Nacional de Trujillo; 2007.
47. Ballester JM, Ballester M, Belaich JP. Purification of the viridicin produced by *Aerococcus viridans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980;17(5):784–8.
48. Capurso L. Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG A Review. Vol. 53, *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2019. 1–41 p.
49. Lozo J, Vukasinovic M, Strahinic I, Topisirovic L. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. *J Food Prot*. 2004;67(12):2727–34.

APÉNDICES

Apéndice 1. Ficha de aislamiento bacteriano

“Efecto de las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas provenientes de yogurt probiótico sobre el crecimiento de <i>Salmonella spp.</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ” Ficha de Aislamiento bacteriano		
Código del aislamiento		
Morfología de la colonia		
Coloración Gram		
Prueba de catalasa		
Prueba de oxidasa		
Coloración de esporas		
Prueba de motilidad		
Prueba de Voges Proskauer		
	SI	NO
Bacteria ácido láctica		

Apéndice 2. Ficha de reporte de halo de inhibición

“Efecto de las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas provenientes de yogurt probiótico sobre el crecimiento de <i>Salmonella spp.</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ” Tamaño de halo de inhibición	
Código del aislamiento	
	Tamaño del halo de inhibición del extracto crudo de bacteriocina
1° repetición	
2° repetición	
3° repetición	
Media	

Apéndice 3. Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas y coloración Gram

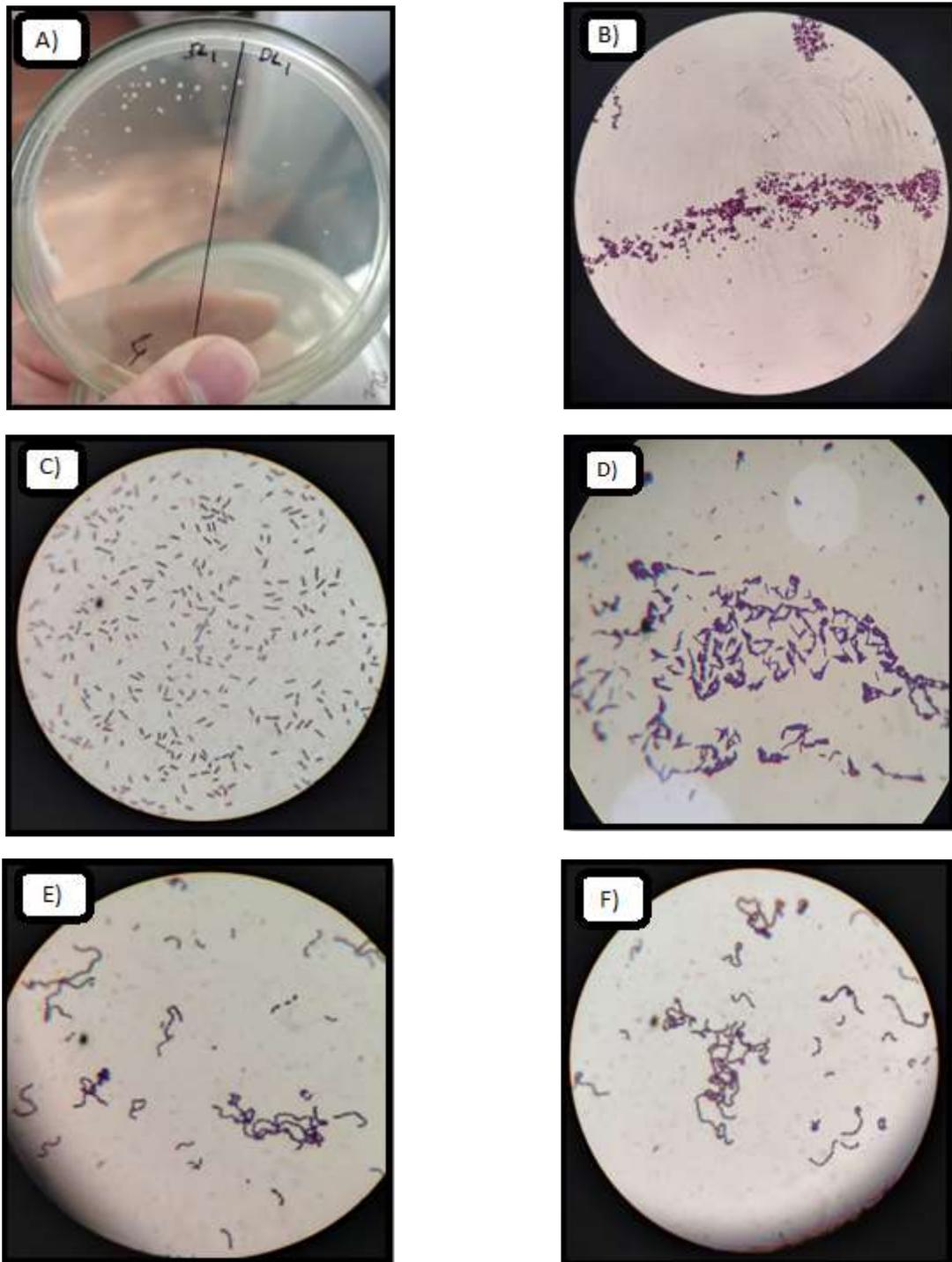


Figura 1. Aislamientos de BAL y coloración Gram. A) Colonias de BAL; B) Tinción Gram del aislamiento L₁Y₁; C) Tinción Gram del aislamiento L₂(8); D) Tinción Gram del aislamiento Bio₂, E) Tinción Gram del aislamiento Bio₄; F) Tinción Gram del aislamiento DL₁(1)

Apéndice 4. Reporte de la identificación molecular de Macrogen.

Standard ID



16S rRNA service report

Order Number : HC00515895
Sample name : 16_contig_1

Information

Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	BI	E-Value	Match/Total	Pct. Id.
CP014164.1	<i>Aerococcus viridans</i>	219987	56374	56523	0	2730	0.0	1485/1488	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Aerococcaceae	<i>Aerococcus</i>	<i>Aerococcus viridans</i>

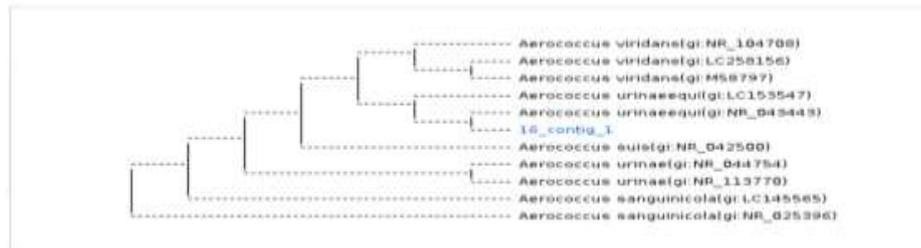


Figura 2. Reporte del aislamiento L₁Y₁ – *Aerococcus viridans*

Standard ID



16S rRNA service report

Order Number : HC00515895
Sample name : 17_contig_1

Information

Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	BI	E-Value	Match/Total	Pct. Id.
NR_113332.1	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	1495	1	1495	100	2781	0.0	1495/1495	100

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Lactobacillaceae	<i>Lactocaseibacillus</i>	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>

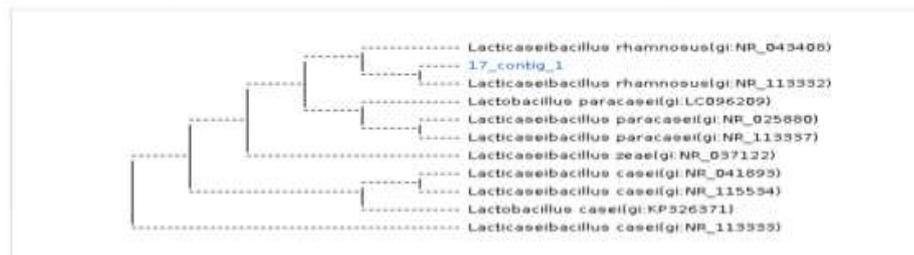


Figura 3. Reporte del aislamiento L₂(8) - *Lactocaseibacillus rhamnosus*

Standard ID

16S rRNA service report

Order Number : HC00515895
Sample name : 18_contig_1

Information

Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	BI	E-Value	Match/Total	Pct. Id.
LC065035.1	Lactobacillus paracasei	1467	768	15	-51	1306	0.0	753/754	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Lactobacillaceae	Lactocaseibacillus	Lactobacillus paracasei

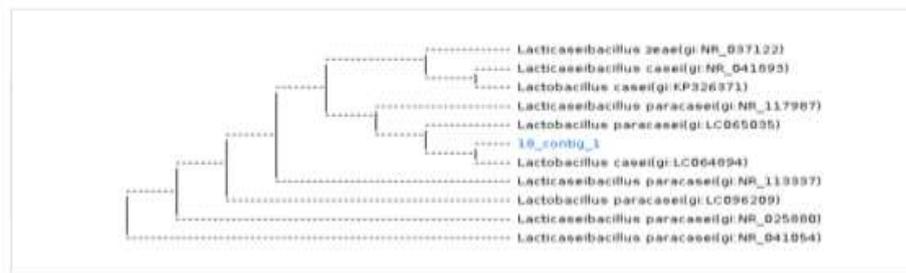


Figura 4. Reporte del aislamiento Bio₂ – *Lactobacillus paracasei*

Standard ID

16S rRNA service report

Order Number : HC00515895
Sample name : 19_contig_1

Information

Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	BI	E-Value	Match/Total	Pct. Id.
NR_042778.1	Streptococcus thermophilus	1539	24	1509	96	2708	0.0	1480/1486	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Streptococcaceae	Streptococcus	Streptococcus thermophilus

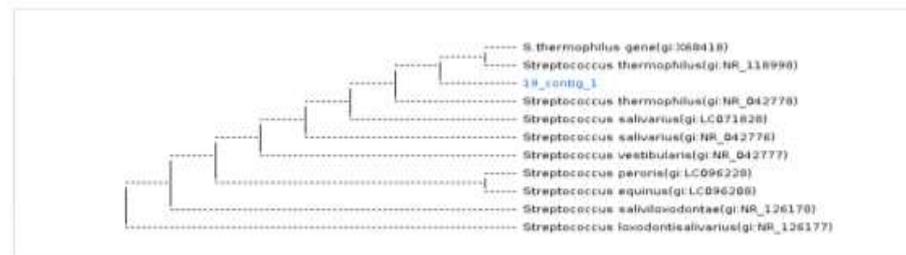


Figura 5. Reporte del aislamiento Bio₄ – *Streptococcus thermophilus*

Standard ID



16S rRNA service report

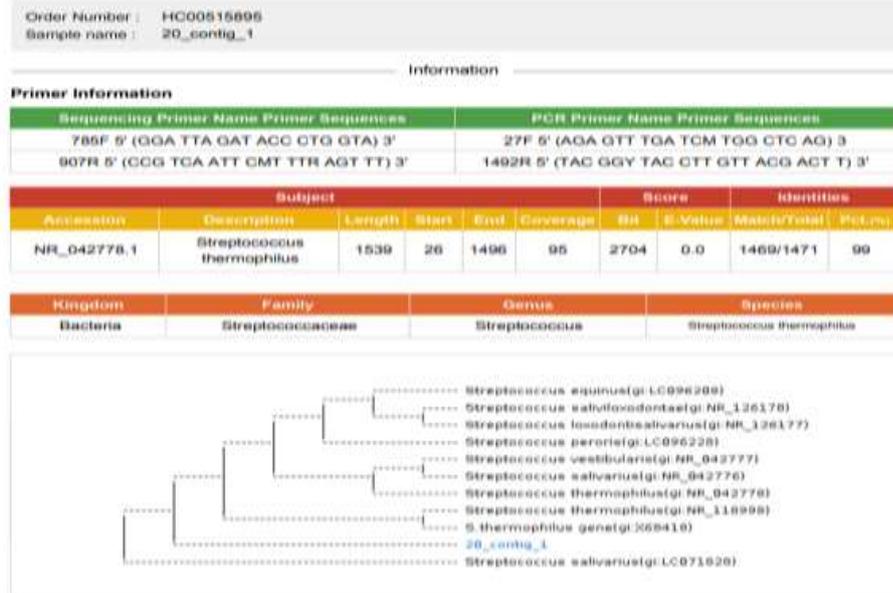


Figura 6. Reporte del aislamiento DL₁(1) - *Streptococcus thermophilus*

Apéndice 5. Prueba de Biuret para determinación cualitativa de producción de proteínas



Figura 7. Resultados de la prueba de Biuret. A) Tubo 1 usado como blanco conteniendo únicamente medio MRS, tubo 2 aislamiento Bio₄, tubo 3 código DL₁(1); B) Tubo 1 aislamiento L₁Y₁; tubo 2 código L₂(8), tubo 3 aislamiento Bio₂

Apéndice 6. Halos de inhibición producidos por los extractos crudos de bacteriocina

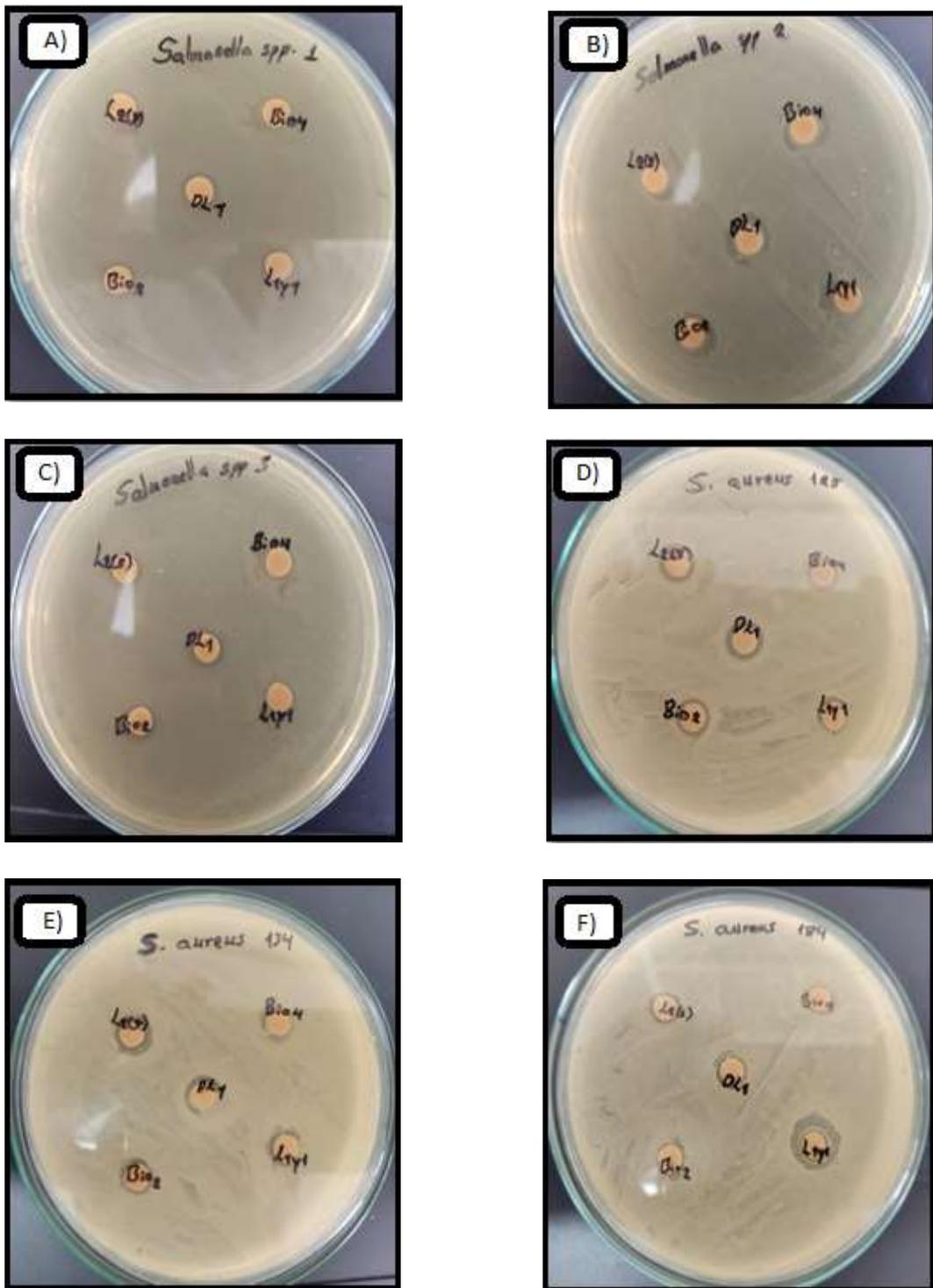


Figura 8. Halos de inhibición formados. A) Halos de inhibición contra el aislamiento de *Salmonella* spp 1; B) Halos de inhibición contra *Salmonella* spp 2; C) Halos de inhibición contra *Salmonella* spp 3; D) Halos de inhibición contra *Staphylococcus aureus* 125; E) Halos de inhibición contra *Staphylococcus aureus* 134; F) Halos de inhibición contra *Staphylococcus aureus* 184.

Apéndice 9. Perfil de sensibilidad de los extractos crudos

Tabla 12. Perfil de sensibilidad de los extractos crudos de bacteriocina

Código	Perfil de sensibilidad			
	Frecuencia		Porcentaje (%)	
	No sensible	Sensible	No sensible	Sensible
L ₁ Y ₁	2	4	33,3	66,7
L ₂ (8)	2	4	33,3	66,7
Bio ₂	2	4	33,3	66,7
Bio ₄	4	2	66,7	33,3
DL ₁ (1)	3	3	50	50

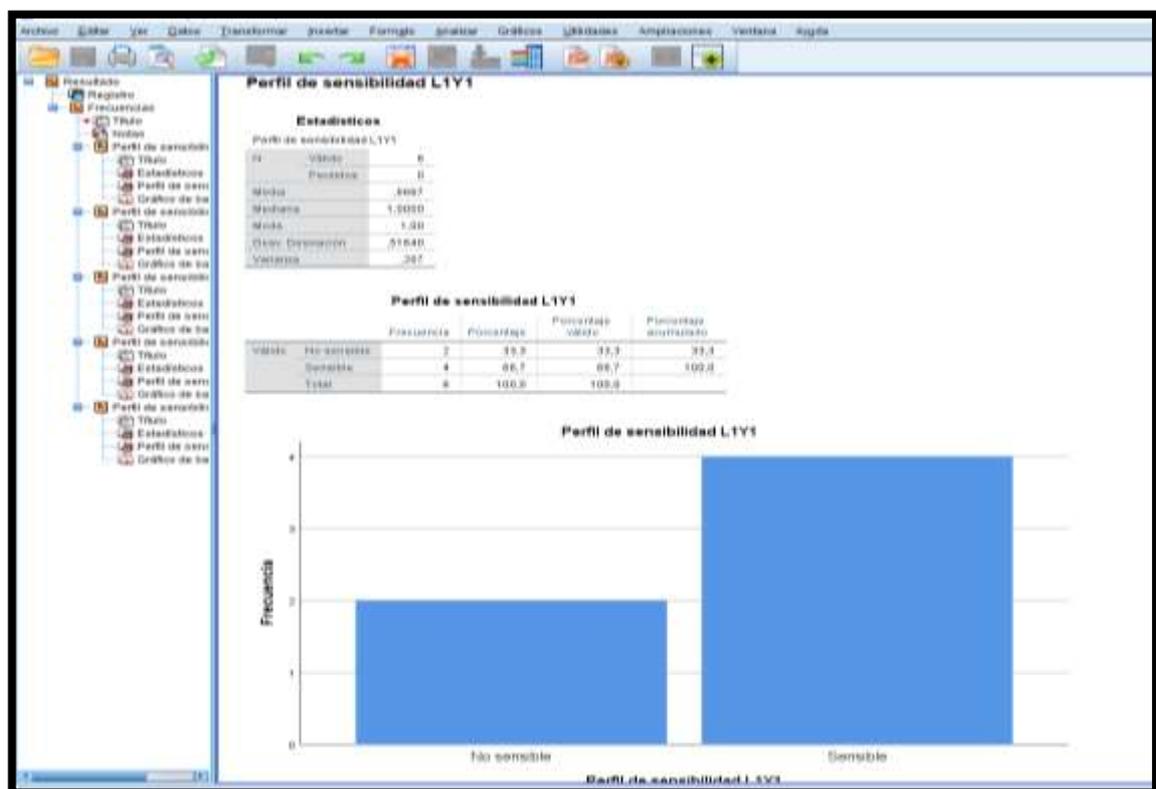


Figura 11. Determinación del perfil de sensibilidad en el programa SPSS

Apéndice 10. Determinación de la normalidad de los datos.

Tabla 13. Prueba de normalidad

Shapiro-Wilk			
Tratamiento	Estadístico	gl	Sig.
L ₁ Y ₁	0,859	6	0,187
L ₂ (8)	0,893	6	0,337
Bio ₂	0,942	6	0,676
Bio ₄	0,974	6	0,916
DL ₁ (1)	0,886	6	0,299
Gentamicina	0,814	6	0,079
Tetraciclina	0,869	6	0,223

Apéndice 11. Prueba de ANOVA.

Tabla 14. Prueba de ANOVA de los tratamientos.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1311,958	6	218,660	103,994	0,000
Dentro de grupos	73,592	35	2,103		
Total	1385,550	41			

Apéndice 12. Prueba de homogeneidad de varianzas

Tabla 15. Prueba de Levene.

Prueba de homogeneidad de varianzas				
	Estadístico de			
	Levene	gl1	gl2	Sig.
Se basa en la media	5,923	6	35	0,000
Se basa en la mediana	1,966	6	35	0,097
Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,966	6	9,851	0,166
Se basa en la media recortada	5,130	6	35	0,001

Apéndice 13. Prueba de T3 de Dunnet

Grupos	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Se basa en la media	5,923	6	35	0,000
Se basa en la mediana	1,966	6	35	0,097
Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,966	6	9,851	0,166
Se basa en la media recortada	5,130	6	35	0,001

Figura 12. Resultados de las comparaciones múltiples de la prueba T3 de Dunnet en SPSS

Apéndice 14. Prueba post hoc

Tabla 16. Post ANOVA T3 de Dunnet.

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
L ₁ Y ₁	6	8,9167	
L ₂ (8)	6	8,5000	
Bio ₂	6	8,4500	
Bio ₄	6	7,7333	
DL ₁ (1)	6	8,1167	
Gentamicina	6		17,8333
Tetraciclina	6		22,8333

ANEXOS

Anexo 1. Pruebas bioquímicas para identificación de BAL(34).

CARACTERISTICAS	BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICA
Morfología de la colonia	Colonias blanquecinas o cremas, pequeñas, de aproximadamente 1-5 mm de diámetro. Con borde entero, convexo, liso, brioso, sin pigmento
Coloración Gram	Bacilos y coco gram positivos
Coloración de esporas	No esporulados
Catalasa	Negativa
Oxidasa	Negativa
Motilidad	Negativa
Voges Proskauer	Negativa

Anexo 2. Breakpoints para *Salmonella* spp (41).

Antibiótico	Resistente (halo en mm)	Sensibilidad media (halo en mm)	Sensible (halo en mm)
sulfametoxazol/trimetoprima	≤10	11-15	≥16
Cefoxitina	≤14	15-17	≥18
Tetraciclina	≤11	12-14	≥15
Gentamicina	≤12	13-14	≥15
Ciprofloxacino	≤21	22-25	≥26

Anexo 3. Breakpoints para *Staphylococcus aureus* (41).

Antibiótico	Resistente (halo en mm)	Sensibilidad media (halo en mm)	Sensible (halo en mm)
Eritromicina	≤13	14-22	≥23
Cefotaxima	≤14	15-22	≥23
Cloranfenicol	≤12	13-17	≥18
Gentamicina	≤12	13-14	≥15
Amikacina	≤14	15-16	≥17
Kanamicina	≤13	14-17	≥18
Tetraciclina	≤14	15-18	≥19

Anexo 4. Escala de Duraffourd (46).

ESCALA DE DURAFFOURD	
CATEGORIA	PUNTAJE (milímetros)
Nula (-)	≤8 mm
Sensible (+)	>8 y ≤14
Muy sensible (++)	>14 y ≤20 mm
Sumamente sensible (+++)	>20 mm