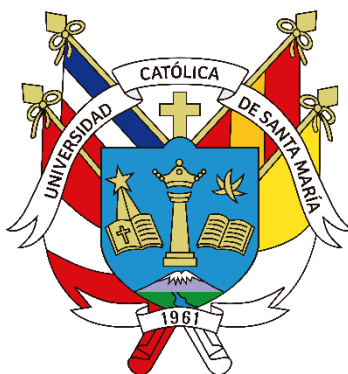


Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**Evaluación del efecto inhibitorio de bacterias ácido lácticas nativas del
lactosuero residual sobre *Escherichia Coli***

Tesis presentada por el bachiller:

Guzmán Delgado, Juan Diego Ernesto

ORCID: 0000-0002-3329-3220

para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Dr. Jiménez Pacheco, Hugo Guillermo

ORCID: 0009-0001-5177-1126

Arequipa – Perú

2024

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 16 de Noviembre del 2023

Dictamen: 010808-C-EPIB-2023

Visto el borrador del expediente 010808, presentado por:

2012230061 - GUZMAN DELGADO JUAN DIEGO ERNESTO

Titulado:

**EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS NATIVAS DEL
LACTOSUERO RESIDUAL SOBRE ESCHERICHIA COLI**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Titulo Profesional/Titulo de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**29263856 - SALINAS SANCHEZ ARMANDO ANTONIO
DICTAMINADOR**



**29389056 - PAZ ALIAGA CARLOS EITEL IVAN
DICTAMINADOR**



**43679772 - LOPEZ ALVAREZ NATALIA PAOLA
DICTAMINADOR**



Evaluación del efecto inhibitorio de bacterias ácido lácticas nativas del lactosuero residual sobre ESCHERICHIA COLI

ORIGINALITY REPORT

4%

SIMILARITY INDEX

4%

INTERNET SOURCES

4%

PUBLICATIONS

5%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

pepite-depot.univ-lille.fr

Internet Source

1%

2

docplayer.es

Internet Source

1%

3

revistas.urp.edu.pe

Internet Source

1%

4

www.lacteoslatam.com

Internet Source

1%

5

link.springer.com

Internet Source

1%

6

www.researchgate.net

Internet Source

1%

Exclude quotes Off

Exclude matches < 1%

Exclude bibliography Off

DEDICATORIA

Mi tesis se la dedico a mi Padre, Walter, por ser un buen tipo y por darme esa herencia benevolente que tengo con los demás, la cual admiro mucho y donde siempre fijare mi norte en ella, a mi Madre, Lourdes, por haberme enseñado luchar desde mi primer día de existencia, a mi hermana, Alexandra, por ser mi primera amiga preocupándose siempre por mí, queriendo lo mejor para mí y mi sobrinita, Andrea que es la alegría de la familia.

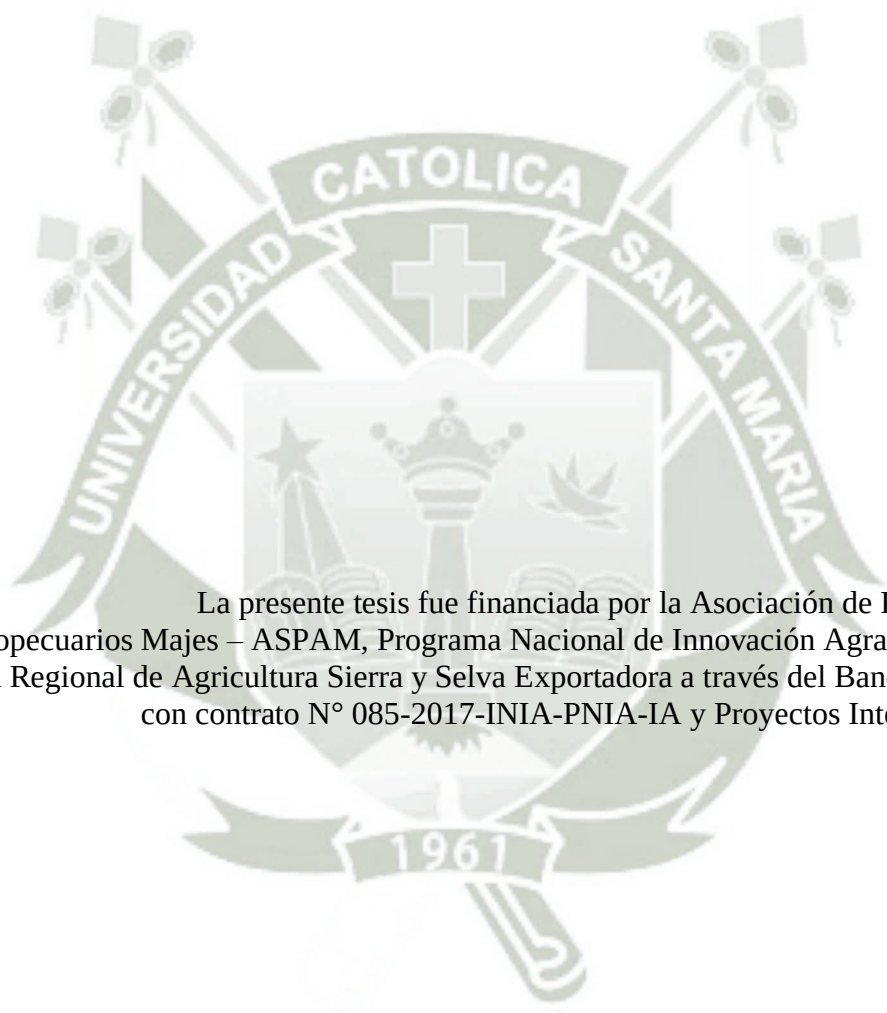
Se la dedico a mis compañeros y a mis amigos, presentes, pasado, y todas esas personas que conocí, quienes sin esperar nada a cambio compartieron conocimiento, alegría, tristezas, experiencias y a todas aquellas personas que durante el transcurso del desarrollo de mi vida profesional desde que comencé la universidad, estuvieron a mi lado apoyándome y lograron alguna manera formar parte de mi aprendizaje y mi carácter de mi desarrollo como profesional. Se los agradezco.

AGRADECIMIENTOS

Por el amor, el apoyo, dedicación y la paciencia recibida de mis padres y mi familia, por cada día estar pendientes y preocupados al verme luchar siguiendo la carrera y culminando con el desarrollo de esta tesis y a mis amigos por estar presente en mi vida y todo su apoyo en cada proyecto que tengo,

Además, agradezco a la Universidad Católica de Santa María a través de su Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables y Medio Ambiente – INNOVERGY por el soporte brindado por el Responsable del Instituto: Dr. Hugo Jiménez Pacheco por su apoyo y todo el intereses en realizar mi proyecto tesis, y todo el equipo de investigación, en los aspectos técnicos y en gestión administrativa, me da mucho gusto haber conocido a todo el equipo y compartir muchos recuerdos experiencias en el laboratorio me llena de alegría conocer tanta gente buena y trabajadora además darles mis más sinceros agradecimiento a Alejandro a pesar de cada error y caída que tenía siempre estuvo ahí sugiriéndome, ayudando, corrigiéndome y apoyándome pacientemente durante el desarrollo de la investigación de esta tesis, mis agradecimientos a Naysha y Stephanie por la ayuda y el apoyo incondicional en el proyecto, agradecimientos a Leonardo por hacer el laboratorio más divertido y no rutinario, mis agradecimientos Eric y Jhon por sacar adelante este proyecto.

Mis más eternos agradecimientos a todos, su ayuda fue un pequeño grano de arena para construir una enorme montaña.



La presente tesis fue financiada por la Asociación de Productores Agropecuarios Majes – ASPAM, Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA), Gerencia Regional de Agricultura Sierra y Selva Exportadora a través del Banco Mundial con contrato N° 085-2017-INIA-PNIA-IA y Proyectos Internos 2019.

RESUMEN

La contaminación microbiológica de coliformes fecales en alimentos y cultivos agrícolas son agentes importantes en enfermedades infecciosas en el ser humano. La resistencia a los antimicrobianos es una alerta mundial debido a que el mal uso de los antibióticos por la automedicación crea una selección natural de bacterias infecciosas capaces de resistir a los bactericidas, por lo tanto, esta selección natural generará genes resistentes a largo plazo haciéndola más compleja. Frente a esta situación, se han encontrado alternativas para solucionar este problema como la acción de las bacterias ácido-lácticas (BAL) que producen metabolitos antimicrobianos. El objetivo principal de esta investigación fue identificar, caracterizar y probar la eficiencia inhibidora bacteriana extraída del suero residual contra patógenos de *Escherichia coli* aislados de estiércol bovino. Esta investigación sirvió para conocer las aplicaciones de las bacterias ácido-lácticas y cómo podrían funcionar como aditivos, aislantes alimentarios o biofertilizantes. Se han probado tres cepas bacterianas, durante los procedimientos experimentales fue posible caracterizarlas por micro y macro características. Además, se realizaron pruebas bioquímicas, físicas y ensayos morfológicos y dando como resultado de estos procedimientos la clase de género de las cepas. Esas bacterias del género son (L1) *Enterococcus*, (L2) *Carnobacterium* y (L3) *Lactobacillus Heterofermentativo*, se evaluaron y se determinó la producción de sustancias inhibidoras similar a la bacteriocina (SISB), dando como positiva la cepa L3. La investigación mostró que L3 SISB tiene la capacidad de inhibir el crecimiento y desarrollo de patógenos como *E. coli* mostrando una zona libre en bacteriocina de concentración 1:1 a las 8 horas de incubación con 9756.05 mm²/mL, 17362.67 mm²/mL a una concentración 1:10, 27759.56 mm²/ mL a una concentración de 1:100, 29585,78 mm²/mL a una concentración de 1:1000 y 18391,08 mm²/mL a una concentración de 1:10000.

KEY WORDS: Bacteriocins, Whey, Fecal Coliforms, Inhibitory Effect, *Escherichia Coli*, Lactic Acid Bacteria, Inhibitory Substances Similar to Bacteriocins.

ABSTRACT

Fecal coliforms microbiologic contamination on food and agricultural crops are important agents in infectious illnesses in the human been. The antimicrobe resistance is a global warning due to the wrong use of antibiotics by the self-medication creates a natural selection of infectious bacteria capable to resist bactericides, thereby, this natural selection will generate resistant genes in long term making it more complex. Regarding this situation, it's been found alternatives to solve this problem like the action of acid lactic bacteria (ALB) that produce antimicrobe metabolites. The main objective of this research was to identify, characterize and test the bacterial inhibitory efficiency extracted from residual whey against *Escherichia coli* pathogens isolated from bovine manure. This research worked to know the acid lactic bacteria applications and how it could work as additives, food insulating or biofertilizers. It's been proved three bacterial strains, during the experimental procedures was possible to characterize them by micro and macro characteristics. Besides, biochemical, physical test and morphological essays were performed and giving the genus kind of the strains as results of this procedures. Those genus bacteria are (L1) *Enterococcus*, (L2) *Carnobacterium* and (L3) *Lactobacillus Heterofermentative*, they were evaluated and determined the producing inhibitory substances-like bacteriocin (BLIS), giving the L3 strain as positive. The investigation showed that L3 BLIS is capable to inhibit the pathogens growth as *E. coli* showing a free zone in 1:1 concentration bacteriocin at 8 hours incubation with 9756.05 mm²/mL, 17362.67 mm²/mL at 1:10 concentration, 27759.56 mm²/mL at 1:100 concentration, 29585.78 mm²/mL at 1:1000 concentration and 18391.08 mm²/mL a at 1:10000 concentration.

KEY WORDS: Bacteriocins, Fecal Coliforms, Biol, Bio-Lac Biofertilizer, Residual Whey, *Lactobacillus*, Bioreactor, Organoleptic Characteristics, Inhibitor Effect.

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
INTRODUCCION	xii
CAPITULO I	xiv
OBJETIVOS	xv
OBJETIVO GENERAL	xv
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	xv
HIPOTESIS.....	xvi
CAPITULO II	1
2. MARCO TEÒRICO.....	2
2.1. RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS Y SU IMPACTO EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN EL SER HUMANO	2
2.2. DEFINICIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	2
2.2.1 ORDEN LACTOBACILLALES.....	4
2.2.2 CLASIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS SEGÚN SU METABOLISMO DE CADA CARBOHIDRATOS.....	8
2.3. COMPONENTES ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS LÁCTICAS 12	
2.4. BACTERIOCINAS	14
2.4.1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS DE BAL (BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS)	16
2.4.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIOCINAS CONTRA PATÓGENOS PRESENTES EN QUESOS	17
2.4.3. PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS INHIBIDORES.....	19
2.5. SUERO LÁCTEO	20
2.5.1. CARACTERÍSTICAS DEL LÁCTOSUERO	21
2.5.2. TIPOS DE SUEROS	21
2.6. COLIFORMES.....	22
2.6.1. BACTERIAS COLIFORMES COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL 22	

2.6.2.	ESCHERICHIA COLI	22
2.6.3.	PROBLEMAS RECURRENTE CON LOS COLIFORMES	23
2.7.	APLICACIONES DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	23
2.7.1.	MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE DEL HUÉSPED	25
2.7.2.	MEJORA DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA.....	26
2.7.3.	MEJORA DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA	27
2.7.4.	MEJORA DE LA DIGESTIBILIDAD DE LOS NUTRIENTES Y CONVERSIÓN ALIMENTICIA	28
2.7.5.	REDUCCIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE TOXINAS	28
	CAPITULO III.....	30
3.	MATERIALES Y METODOS.....	31
3.1.	MATERIALES.....	31
3.1.1.	<i>Muestras y/o unidades biológicas:</i>	31
3.1.2.	<i>Material de laboratorio:</i>	31
3.1.3.	<i>Insumos y reactivos químicos:</i>	31
3.1.4.	<i>Equipos e instrumentación:</i>	32
3.2.	METODOLOGÍA.	33
3.2.1.	DETERMINAR LA IDENTIDAD TAXONOMICA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROVENIENTES DE LACTOSUERO RESIDUAL.	33
3.2.1.1.	Aislamiento de las bacterias ácido lácticas de lactosuero residual	33
3.2.1.2.	Crecimiento de colonias en Agar M.R.S.....	35
3.2.1.3.	Fermentación de glucosa para la producción de gas.	35
3.2.1.4.	Identificación macroscópica y microscópica de los microorganismos aislados.	36
3.2.1.5.	Crecimiento a temperaturas de 10 °C y 45 °C.....	36
3.2.1.6.	Prueba para saber el tipo de isómero del Ácido Láctico producido por una bacteria ácido-láctica	36
3.2.1.7.	Tolerancia a pH 4.5.	37
3.2.2.	IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS PRODUCTORAS DE SUSTANCIAS INHIBITORIAS SIMILARES A LAS BACTERIOCINAS EVALUANDO EL EFECTO INHIBITORIO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS NATIVAS DEL LACTOSUERO SOBRE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	37
3.2.3.	DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LAS SUSTANCIAS INHIBITORIAS SIMILARES A LAS BACTERIOCINAS PROVENIENTES DE LAS BACTERIAS ACIDOLACTICAS NATIVAS SOBRE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	40
	CAPITULO IV.....	43
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44

4.1. DETERMINAR LA IDENTIDAD TAXONOMICA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROVENIENTES DE LACTOSUERO RESIDUAL.	44
4.1.1. AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE LACTOSUERO RESIDUAL.....	44
4.1.2. PRUEBAS MACROSCÓPICAS.....	45
4.1.3. PRUEBAS MICROSCOPICAS	47
4.1.3.1. TINCIÓN GRAM.....	47
4.1.4. CARACTERIZAR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS MEDIANTE PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.....	49
4.1.4.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	49
4.1.4.1.1. FERMENTACIÓN DE GLUCOSA PARA LA PRODUCCIÓN DE GAS.....	49
4.1.4.1.2. PRUEBA PARA SABER EL TIPO DE ISÓMERO DEL ÁCIDO LÁCTICO PRODUCIDO.	49
4.1.4.2. PRUEBAS FISICAS	50
4.1.4.2.1. CRECIMIENTO A TEMPERATURAS DE 10 °C Y 45 °C.	50
4.1.4.2.2. TOLERANCIA A pH 4.5.	50
4.2. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE SISB SUSTANCIAS INHIBIDORAS SIMILARES A BACTERIOCINAS EVALUANDO EL EFECTO INHIBITORIO DE LAS BACTERIAS ACIDO-LACTICAS NATIVAS DEL LACTOSUERO SOBRE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	52
4.3. DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LAS SUSTANCIAS INHIBITORIAS SIMILARES A LAS BACTERIOCINA PROVENIENTES DE LAS BACTERIAS ACIDOLACTICAS NATIVAS SOBRE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	56
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	63
REFERENCIAS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fermentación láctica homofermentativa.	9
Figura 2: Fermentación láctica heterofermentativa.	9
Figura 3: Esquema general de las características y composición de la <i>Escherichia Coli</i>	23
Figura 4: Mecanismos de inhibición de patógenos por BAL-probióticos.	25
Figura 5: Diagrama de flujo para la identificación de géneros de Bacterias Ácido-Lácticas por características fenotípicas. C: cocos; R: varillas; (-): negativo; (+): positivo; L, D y DL: isómeros.	33
Figura 6: Flujograma del proceso obtención de suero libre de células de las BAL y el ensayo de difusión en disco de agar se utilizó para detectar cepas de Bacterias Acido-Lacticas productoras de sustancias inhibidoras similares a bacteriocinas.	39
Figura 7: Colonias observadas en el cultivo de agar MRS.	45
Figura 8: En el cultivo de la muestra L1 se observan colonias pequeñas y esparcidas por el medio por estría, lisas de borde uniforme, de color crema, blanco u opacos.	45
Figura 9: En el cultivo de la muestra L2 se observan colonias grandes y esparcidas por el medio por estría, papilada, rizoide y de borde redondeado, de color blanco.	46
Figura 10: En el cultivo de la muestra L3 se observan colonias grandes y esparcidas por el medio por estría, planoconvexa, rizoide y de borde ondulado, de color blanco cremoso y beige.	46
Figura 11: En el cultivo de la muestra L1 se observaron pequeños Cocos, Gram positivo de una de las cepas aisladas del lacto suero residual.	47
Figura 12: En el cultivo de la muestra L2 se observaron bacilos largos, Gram positivo de una de las cepas aisladas del lacto suero residual.	48
Figura 13: En el cultivo de la muestra L3 se observaron bacilos pequeños, Gram positivo de una de las cepas aisladas del lacto suero residual.	48
Figura 14: Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía de la Bacterias Ácidos Lácticas	5
Tabla 2: Actividad Antimicrobiana de Bacteriocinas en Quesos.....	19
Tabla 3. En la siguiente tabla de Diluciones seriadas que se utilizó para la prueba del efecto Inhibidor de las bacterias acido-lácticas sobre e.coli se puede notar como desde el recipiente Madre se mezcla con el tubo 1 y luego del tubo 1 al tubo 2 y así consecutivamente hasta llegar a la solución que se necesite.....	42
Tabla 4. Resultados de la Identificación de las Bacterias Aisladas del Suero Láctico Residual.	51
Tabla 5. Resultado de la identificación de bacterias productoras de SISB Sustancias Inhibidoras Similares a Bacteriocinas.	53
Tabla 6. Cuadro de resultados del ensayo de difusión en disco en agar.....	56
Tabla 7. Tabla resumen del Análisis de Varianza.....	58
Tabla 8. Cuadro Comparando de los Resultados Obtenidos con otras Investigaciones relacionadas.	59



INTRODUCCION

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa un preocupación creciente en el ámbito de la salud pública global, Este fenómeno se refiere a la capacidad de microorganismos, tales como bacterias, virus, hongos y parásitos, que resisten los efectos de los medicamentos antimicrobianos que fueron diseñados para combatirlos todo esto es causado por el uso excesivo e inapropiado de antibióticos y otros agentes antimicrobianos ha contribuido significativamente a la aparición y propagación de cepas resistentes, la existencia de este tipo de bacterias con resistencia antimicrobiales es un llamado de alerta que afecta la salud humana, animal y ambiental, éste problema sucede debido a que la población abusa con el uso de antibióticos y otros antimicrobianos sin el diagnóstico de un profesional de la salud, además de no seguir a pie de la letra las recetas medicadas, enfermedades como la neumonía, la gonorrea y las infecciones postoperatorias, así como el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), la tuberculosis y la malaria, son infecciones cada vez más difíciles de tratar debido a la Resistencia Antimicrobiana, estas malas prácticas también sucede en la crianza de animales, cultivos y el agua, ante todo ello, sino se busca una alternativa para controlar ésta problemática, se prevé que la resistencia antimicrobiana tenga consecuencias sociales, pérdidas económicas y consecuencias sanitaria, que perjudicará gravemente el desarrollo sostenible de los países (1).

En el Perú es uno de los pocos países en los cuales se han podido encontrar investigaciones relacionadas con la susceptibilidad de *Escherichia coli* productoras de diarreas en el ser humano, en otros casos, la resistencia en *Escherichia Coli* para cepas provenientes de infecciones urinarias ambulatorias es muy elevada, casos similares se presentan en países de Sudamérica (1).

El otro panorama actual para el sector de la Agricultura no es muy alentador. El deterioro de las tierras cultivables destinados a la agricultura está cada día incrementándose más, problemas con plagas y enfermedades producto del cambio climático no se ha estabilizado, sin embargo, productos como los agroquímicos que se utilizan para combatir estos problemas conlleva a que los cultivos tengan una alta carga de agroquímicos dañinos para el ser humano. Prácticas como la utilización de biofertilizantes, bio-conservantes o consorcios microbianos, representa una oportunidad para potenciar la capacidad productiva de los suelos y mejorar la calidad nutricional de los alimentos. Aun así, existe un problema en el deficiente tratamiento de los fertilizantes, la presencia de coliformes fecales como la *Escherichia coli* en altas concentraciones, lo que amenaza la salud de quienes consumen estos productos agrícolas.

En el Perú existe una población Bovina de 5 125 743 ejemplares de las cuales se produce lácteos y carne para el consumo de la población. En el 2022, la producción nacional de queso alcanzó las 145.765 toneladas esto quiere decir que se produjo 1,457,650 litros de lactosuero durante ese año, el lactosuero es el mayor contaminante hídrico debido a que, sin previo tratamiento, es descargado a los ríos y alcantarillados incrementando la carga de contaminantes del agua residual que discurre por dicho sistema (2).

Tanto los consorcios microbianos comerciales y el suero de leche, contiene bacterias ácido lácticas, bacterias probióticas y el uso de éste tipo de bacterias ha permitido un sinnúmero de aplicaciones como la obtención de bio-conservantes, consorcio microbianos o medicamentos a través de procesos de fermentación y aislamiento de su principio activo para usarlos con la finalidad de combatir la contaminación de patógenos (3) (4).

CAPITULO I



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto inhibitorio de las Bacterias Ácido-Lácticas de lactosuero residual sobre la viabilidad de coliformes fecales

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la identidad taxonómica de las Bacterias Ácido-Lácticas provenientes de lactosuero residual
- Identificación de las Bacterias productoras de Sustancias Inhibitorias Similares a las Bacteriocinas evaluando el efecto inhibitorio de las Bacterias Ácido-Lácticas nativas del lactosuero sobre *Escherichia Coli*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de las Sustancias Inhibitorias Similares a las Bacteriocina provenientes de las Bacterias Ácido-Lácticas nativas sobre *Escherichia Coli*.

HIPOTESIS

Dado que las Bacterias Ácido-Lácticas poseen bacteriocinas; es probable que, estas inhiban el crecimiento de patógenos como *Escherichia Coli*.



CAPITULO II



2. MARCO TEÓRICO

2.1. RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS Y SU IMPACTO EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES EN EL SER HUMANO

Uno de los descubrimientos más importantes para la medicina moderna, fueron los antibióticos, éstos son claves para combatir la morbilidad y la mortalidad de cientos de enfermedades. Sin embargo, en los últimos años, los microorganismos han estado desarrollando una resistencia a los antibióticos, esto es un problema difícil para la medicina. Según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), 35000 personas mueren a causa de infecciones resistentes a los antibióticos además, los colaboradores de la revista Lancet informaron que la tasa de mortalidad más alta asociada con la resistencia a los antibióticos se encuentra en el Sahara (27,3 por 100 000) y la más baja en Australasia (6,5 por 100 000) (Murray et al., 2022). La presencia de aislamientos resistentes a múltiples fármacos (MDR) tiene algunas desventajas, que incluyen costos más altos, hospitalización prolongada y fallas en el tratamiento. La resistencia a los antibióticos ha causado un aumento de la morbilidad, las estancias hospitalarias prolongadas y los costos de atención médica, es fundamental encontrar una forma viable de combatir o incluso reducir la resistencia a los antibióticos (5) (6).

2.2. DEFINICIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Se han utilizado microorganismos para la producción de alimentos previamente fermentados y métodos de conservación de alimentos durante miles de años, sin saber la existencia de estos hasta la invención del microscopio, por primera vez en 1668 por A. Leeuwenhoek décadas posteriores en 1857 Louis Pasteur estudio la interacción de los microorganismos con la producción de estos alimentos. Así empezó una línea de investigación basada en el estudio de microorganismos en alimentos (7) (8).

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son microorganismos propios de los alimentos los cuales han sido estudiados desde su descubrimiento, estos microorganismos se estudian a detalle sus aplicaciones en amplia variedad en producción de alimentos, cultivo para plantas, alimento para animales y su rol en el medio que se desarrolla. En el manual de

Bergey's de 1986 define al grupo de las "Bacterias Ácido-Lácticas" como grupo heterogéneo de microorganismos Gram positivos caracterizados por su producción de ácido láctico a partir de la fermentación de nutrientes como los carbohidratos el cual es su principal producto metabólico (9).

Muchas de estas bacterias tienen propiedades probióticas las cuales juegan un papel crucial en la salud humana y se encuentran presentes en los alimentos fermentados como yogures, quesos bajo proceso de maduración, productos cárnicos e incluso en ciertas preparaciones de vegetales, también se encuentran microorganismos que coexisten en la piel y la mucosa del tracto digestivo y genital tanto en humanos como en animales, todas estas bacterias han sido identificadas con regularidad en estos lugares, mostrando variabilidad en su presencia dependiendo del organismo del cual se han aislado otro dato interesante es que este grupo bacteriano comienza a colonizar el sistema digestivo desde el momento del nacimiento de un nuevo individuo, aunque esta colonización tiende a disminuir con la edad debido a la baja adherencia a la mucosa intestinal.; por otro lado en plantas y animales, estos microorganismos forman parte del microbiota y proveen nutrientes esenciales para su desarrollo o protección, en humanos destaca su papel en actividades antiinflamatorias, anti colesterol y propiedades antibacterianas, es por ello que se necesita observar, aislar, purificar, identificar, clasificar, organizar y definir grupos de bacterias con características morfológicas, metabólicas y fisiológicas similares, esto incluyen el orden de las *Lactobacillales* y las *Bifidobacteriales*, gracias al nacimiento de la filogenia molecular y la comparación de secuencias de ARN ribosómico. Durante la década de 1960, se pudo establecer un sistema evolutivo al analizar las secuencias de ADN de dos bacterias lo que permitió separarlas en órdenes distintos, por un lado, el orden de las *Lactobacillales* perteneciente a la clase *Bacilli* y por otro, las *Bifidobacteriales* en la clase *Actinobacteria* (10) (11).

Durante buena parte del siglo XX, los lactobacilos y las bifidobacterias fueron clasificados conjuntamente en el mismo esquema. Por esta razón, se utilizó el término "Bacterias-Lácticas" para referirse a ambos grupos de microorganismos, principalmente debido a su capacidad compartida para producir ácido láctico. Sin embargo, a principios de la década

de 1930, comenzaron a surgir datos que indicaban que las bifidobacterias estaban más relacionadas con *Actinomyces* que con los lactobacilos. Aunque estos estudios no alteraron la clasificación de inmediato, los análisis moleculares en la década de 1960 revelaron diferencias entre las bifidobacterias y otras bacterias lácticas, a pesar de las similitudes fenotípicas estos análisis mostraron el contenido de G+C de las bifidobacterias supera el 50%, mientras que el de las *Lactobacillales* es inferior al 50%, lo que las acercaba al grupo de los actinomicetos. Los análisis de la composición de la pared celular también indicaron características distintivas en las bifidobacterias que las separaban de las demás bacterias lácticas. A pesar de estas evidencias, la controversia persistió y no se consideraron suficientes para cambiar la posición de las bifidobacterias hasta que, en los años 60 y 70, se obtuvieron más pruebas que indicaban que las bifidobacterias y los lactobacilos constituían siendo grupos separados. Finalmente, el análisis filogenético de las secuencias de ARN ribosómico contribuyó a confirmar esta distinción de manera convincente la clasificación de las *Bifidobacterias* como un orden separado dentro de la clase *Actinobacteria*. En la actualidad el término “Bacterias-Lácticas” engloba a bacterias del orden *Lactobacillales* y bacterias del orden *Bifidobacteriales*. Por ello actualmente el término bacterias lácticas puede referirse tanto a bacterias del orden *Lactobacillales* exclusivamente como al conjunto de *Lactobacillales* y *Bifidobacterias* (12) (13).

2.2.1 ORDEN LACTOBACILLALES

Las Bacterias Ácido Láctico pertenecen al filo *Firmicutes*, dentro de la clase *Bacilli* y el orden *Lactobacillales*, incluidas 7 familias (*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae* y *Acetoanaerobium*) y distribuidas en más de 19 géneros (*Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, entre otros). Las características comunes de la mayoría de estas bacterias son: la morfología cocoide, bacilar o cocobacilar, Gram positivos, no esporulados, aerotolerantes, microaerófilicos o anaerobios facultativos, mesófilos, sin citocromos, catalasa negativos (en algunos casos pueden tener actividad de pseudocatalasa), acidófilos o acidotolerantes, de metabolismo quimiorganótrofo y

estrictamente fermentativo, que producen ácido láctico como principal producto de la fermentación (9).

Dentro de este grupo de Bacterias Ácido-Lácticas, existen géneros que destacan por su relevancia en aplicaciones biotecnológicas. Estos géneros son fundamentales tanto en el desarrollo de productos alimenticios donde se aprovecha su capacidad para mejorar significativamente la calidad y funcionalidad de los alimentos, así como avanzar en la caracterización de metabolitos secundarios que poseen actividad antimicrobiana actividad antimicrobiana.

Tabla 1: Taxonomía de la Bacterias Ácidos Lácticas

Reino	Bacteria
Filo	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Lactobacillales</i>
Familias	<i>Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae, Streptococcaceae, Acetoanaerobium</i>
Géneros	<i>Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Weissella, Lactococcus, Streptococcus, Vagococcus, Tetragenococcus, entre otros).</i>

Lactococcus actualmente existen 12 especies descubiertas (*L. fujiensis*, *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactic* entre otras) y es representado por la especie tipo *Lactococcus lactis*, con tres subespecies *lactis*, *cremoris* y *hordinae*. Las bacterias de este género son esféricas o células ovoides se presentan individualmente, en pares o cadenas de la cadena son a menudo alargadas, con carácter homofermentativo, Gram-Positivo, no forman esporas, inmóviles y no son β -hemolítico, facultativamente anaeróbico; catalasa negativa y son capaces de crecer a 10°C o menos. Generalmente crece en NaCl al 4% (p/v) con la excepción de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* que solo tolera el 2% (p/v) NaCl (9).

Leuconostoc actualmente existen 18 especies (*L. mesenteroides*, *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, *L. argentinum*, *L. pseudomesenteroides*, *L. carnosum*, *L. citreum*, *L.*

amelibiosum, *L. durionis*, *L. fallax*, *L. ficulneum*, *L. fructosum*, *L. gasicomitatum*, *L. inhae*, *L. kimchii*, *L. lactis*, entre otras.) Son Gram-positivas, inmóviles y asporógenas. Generalmente son células elipsoidales hasta esféricas, a menudo alargadas, generalmente en pares o cadenas, las células cultivadas en un medio de glucosa son alargadas y parecen morfológicamente más cercanas a los lactobacilos que a los estreptococos. La mayoría de las cepas forman células cocoides cuando se cultivan en leche. Las células pueden presentarse individualmente o en pares, y formar cadenas de longitud corta a mediana. Cuando se cultivan en un medio sólido, las células se alargan y pueden confundirse con bastoncillos. No se forman verdaderas cápsulas celulares. Todo el género tiene carácter heterofermentativo, anaerobio facultativo y Ciertas cepas de *Leuconostoc mesenteroides* producen dextrano extracelular, a partir de sacarosa (9).

Pediococcus actualmente contiene 12 especies (*P. damnosus*, *P. acidilactici*, *P. dextrnicus*, *P. cellicola*, *P. claussenii*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentasaceus*, *P. stilesii*, entre otras.). Las células son inmóviles, esféricas, suelen disponerse en pares o tétradas, y se dividen a lo largo de dos planos de simetría, pero nunca cadenas. Las células pueden aparecer solas o en pares, especialmente durante el crecimiento exponencial temprano o medio. Las células individuales miden de 0,5 a 1,0 μm . Las células son Gram positivas, asporogénicas y oxidasas negativas. Estas células son estrictamente homofermentativos produce ácido láctico, pero no CO_2 a partir de la glucosa. Químio-organotrófico. Facultativamente anaeróbico (9).

Lactobacillus Actualmente contiene más de 180 especies (*L. acidophilus*, *L. Ost*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. delbrueckii*, *L. acetotolerans*, *L. acidifarinae*, *L. acidipiscis*, *L. agilis*, *L. algidus*, *L. alimentarius*, *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. animalis*, *L. antri*, *L. aviarius*, *L. bifementans*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. coleohominis*, *L. collinoides*, *L. coryniformis*, *L. crispatus*, *L. curvatus*, *L. cypricasei*, *L. diolivorans*, *L. durianis*, *L. equi*, *L. farciminis*, *L. ferintoshensis*, *L. fermentum*, entre otros.). Las células varían desde forma de bastones largas y delgadas, a veces dobladas, hasta cocobacilos cortos, coliformes, formando cadenas, con motilidad poco común; no formador de esporas y tinción Gram Positivo. Se caracterizan por tener un metabolismo

homofermentativo, y en algunas especies, heterofermentativo; sacaroclastica. Al menos la mitad del carbono del producto final es lactato. Los productos adicionales pueden ser acetato, etanol, CO₂, formiato o succinato. Facultativamente anaeróbico; crecimiento superficial en medio sólido generalmente mejorado por anaerobiosis o presión de oxígeno reducida y 5 a 10% de CO₂. No digiere caseína, pero la mayoría de las cepas producen pequeñas cantidades de nitrógeno soluble. No se producen indol ni H₂S. Las condiciones estrictamente aeróbicas suelen inhibir el crecimiento; algunos son anaerobios en aislamiento. Son aerotolerantes a pesar de la ausencia completa de la cadena respiratoria. Catalasa y citocromo negativos (ausencia de porfirinas). Producción de pigmentación amarilla o naranja a óxido o rojo ladrillo. El rango de temperatura de crecimiento 2 – 53 °C, óptimo generalmente 30 a 40 °C. Su pH óptimo por lo general de 5.5 a 6.2; el crecimiento generalmente ocurre a pH 5.0 o menos; la tasa de crecimiento a menudo se reduce en condiciones neutras o inicialmente alcalinas (9).

Enterococcus Actualmente contiene más de 60 especies (*E. faecalis*, *E. aquimarinus*, *E. asini*, *E. avium*, *E. caccae*, *E. camelliae*, *E. canintestini*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. devriesei*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hermannienseis*, *E. hirae*, *E. italicus*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus* entre otros.). Son bacterias gram positivas, Las células son ovoides, aparecen solas, en pares o en cadenas cortas y a menudo se alargan. No formador de esporas. Algunas cepas pueden ser móviles por sus escasos flagelos. Mientras que otras especies tienen pigmentación amarilla. Anaerobio facultativo. Algunas especies son carboxifilas (dependientes del CO₂). Catalasa negativa, pero algunas cepas muestran actividad pseudocatalasa cuando se cultivan en agar sangre. La actividad hemolítica es variable y altamente dependiente de la especie. La temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las especies es de 35-37 °C. Muchas especies (pero no todas) pueden crecer a 42 °C incluso 45 °C y (lentamente) a 10 °C. Muy resistente a la desecación. Crecimiento quimio-organotrófico. Requerimientos de nutrientes generalmente complejos. Metabolismo fermentativo.

Fermentación homofermentativa del ácido láctico. El producto final predominante de la fermentación de la glucosa es el ácido L (+)-láctico (9).

2.2.2 CLASIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS SEGÚN SU METABOLISMO DE CADA CARBOHIDRATOS

La morfología ha sido, durante años, una de las características más importantes de la clasificación de las Bacterias Acido-Lácticas. Por ejemplo, los lactobacilos se diferencian de los estreptococos, los pediococos y los leuconostocs, por no formar tétradas. La morfología sigue siendo importante, pero ahora es considerado como un indicador muy bajo en lo que representa el parentesco. Esto es evidente a partir de géneros de Bacterias Acido-Lácticas como *Weissella* que su morfología varía en células en forma de cocos y bastones (14).

Pruebas fisiológicas simples, como crecimiento a diferentes temperaturas, ácidas, alcalinas y la tolerancia a la sal y la producción de gas siguen siendo útiles, pero cada vez es más difícil utilizar estos para la identificación del género. Por ejemplo, en condiciones estándar, la producción de gas (CO₂) a partir de los carbohidratos consumidos, se utiliza para distinguir entre los dos principales modos de fermentación que se producen: Las Bacterias Acido-Lácticas homofermentativas que sintetizan una fermentación homoláctica de la glucosa da como resultado la formación de ácido láctico casi en su totalidad como producto final, por la vía Embden-Meyer – glicólisis, ver figura. 1 y las Bacterias Ácido-Lácticas heterofermentativas que sintetizan una fermentación heteroláctica que produce menor cantidad de ácido láctico además de producir etanol o ácido acético y CO₂ a través de rutas alternativas como la del ácido-6-fosfogluónico ver figura 2 (15) (16).

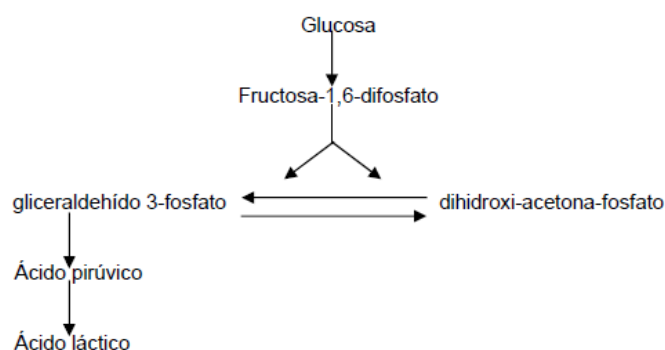


Figura 1: Fermentación láctica homofermentativa (17).

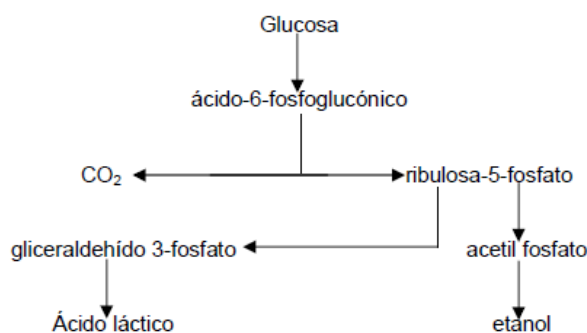


Figura 2: Fermentación láctica heterofermentativa (17).

Existe una clasificación detallada de las bacterias lácticas con respecto al metabolismo de los carbohidratos consumidos, todas estas clasificaciones las dividían en tres categorías principales: Homofermentativas obligadas, Heterofermentativas obligadas y Heterofermentativas facultativas.

- **Homofermentativas obligadas:** Se incluye a las especies del grupo *Thermobacterium* y otras especies nuevas descritas (18).

Sus células son alargadas, rectas y a menudo en forma de varilla, durante la fermentación ácido láctico es su principal producto, estos microorganismos se dividen en dos conjuntos de especies siendo el principal el *Lactobacillus Delbrueckii* y *Lactobacillus. Acidophilus*. Dentro de *Lactobacillus Delbrueckii*, las subespecies muestran una homología de su ADN en más del 80%, éste alto grado

de homología genética indica una estrecha relación entre las distintas subespecies de *Lactobacillus delbrueckii* (19).

Las subespecies como *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* que fermentan sacarosa, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* que fermentan lactosa, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactic*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. leichmani*, tienen la capacidad de producir 18 g/litro de ácido láctico en su forma D (-), en cuanto a las especies de *Lactobacillus. Acidophilus* se describe como un grupo muy heterogéneo que se organiza en tres subgrupos, cada uno caracterizados por especies específicas. *Lactobacillus. acidophilus*, *Lactobacillus. helveticus*, *Lactobacillus. gasseri*. Se destaca que *Lactobacillus helveticus* se considera una derivada de *Lactobacillus acidophilus* y se caracteriza por su adaptación a medios ácidos, como el lactosuero ácido, además, se menciona que el *Lactobacillus helveticus* es el productor más grande de ácido láctico en su forma D (-) entre los *Lactobacillus*, alcanzando hasta 27 g/litro (18).

- **Homofermentativos facultativos:** Este grupo incluye a *Streptobacterium* y especies nuevas. En este caso participan en la fermentación de hexosas siendo esta homofermentativa. Las células de estos microorganismos son cortas, a menudo se dispone de filamentos. Este grupo es muy diverso y se organiza en tres subgrupos principales centrados en *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, y el grupo de *Lb. sake* – *Lb. curvatus* – *Lb. bavaricus*. Estos microorganismos se caracterizan por producir cantidades relativamente bajas de ácido láctico que oscilan entre 3 a 13 gr/litro en su forma L (+) o D (-) según la especie. En particular *Lb. plantarum* es una especie grande que incluye cepas con variabilidad genética. El conjunto de *Lb. casei* se identifica tres genotipos: un grupo de tres subespecies *Lb. casei subsp. casei*, *Lb. casei subsp. pseudopantarum* y *Lb. casei subsp. tolerans* y el tercer grupo constituido por *Lb. casei subsp. Rhamnosus* (18).
- **Heterofermentativos obligatorios:** Se incluye a los del grupo *Betabacterium*. Estas bacterias como resultado de la fermentación de las hexosas, que producen ácido láctico, acético, (o etanol) y CO₂ en una proporción 1:1:1; la de las pentosas, el producto de la fermentación incluye ácido láctico y acético. Estas bacterias

tienen unas formas cortas, rectas y separadas. A pesar de su diversidad muestran poca homología entre ellas, la producción de ácido por estas bacterias es relativamente débil, alcanzando los 5 g/litro y el ácido láctico producido es de la forma D (-). Algunas especies más destacables son *Lactobacillus some*, *Lactobacillus. buchneri* y *Lactobacillus. reuteri*; *Lactobacillus fermentum*; *Lactobacillus brevis*; *Lactobacillus bif fermentans*, este último es capaz de producir hidrogeno gracias a una enzima llamada formiato hidrogeno liasa (18).

Estas bacterias tienen requerimientos nutricionales complejos necesitando factores de crecimiento que son sustancias esenciales que un organismo no puede sintetizar por sí mismo y que necesita adquirir del entorno para su crecimiento y reproducción, para los microorganismos como bacterias, algunos factores de crecimiento comunes incluyen: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas. Todas estas demandas nutricionales se encuentran en la leche, siendo una razón clave por la cual pueden desarrollarse en entornos nutricionalmente ricos. En el laboratorio para su aislamiento y cultivo se utilizan medios selectivos como el caldo o agar MRS, agar Rogosa los cuales están diseñados para favorecer el crecimiento de ciertos grupos de microorganismos, en particular, las bacterias lácticas como *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Otra característica distintiva es su capacidad para tolerar al pH ácido generalmente alrededor de entre 5.0, o en rangos menores, pero conforme el medio se va acidificando, algunas especies pueden ser inhibidas en mayor medida. Este rango de tolerancia al pH ácido es un factor importante para comprender su comportamiento y crecimiento en distintos entornos (17).

Las bacterias homofermentativas obligatorias y facultativas como *Lb. caucasicus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb acidophilus* y *Lb. Delbrueckii* estos microorganismos tienen un rango de temperatura óptimo para su crecimiento que va desde 20 °C a 40 °C y variando entre géneros. Son microorganismos de rápido crecimiento lo que sugiere que tienen una tasa de reproducción relativamente alta, poseen genomas pequeños lo que implica que tienen una cantidad limitada de material genético, esto implicaría estar relacionado con su metabolismo simple y su rápida replicación La mayoría de los *Lactobacillus* producen únicamente una forma isomérica de ácido láctico;

las formas isoméricas de lactato deshidrogenasa presente en *Lactobacillus* determinan el tipo de isómero de ácido láctico producido, ya que la deshidrogenasa láctica es esteroespecífica; las especies de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus* y *Tetragenococcus* producen únicamente isómeros D. Sin embargo, algunos *Lactobacillus* producen formas racémicas donde el isómero predominante puede variar debido a factores como la cantidad de oxígeno presente, la concentración de cloruro de sodio (NaCl), el tipo de fermentación, cambios de pH y la concentración de sustrato. Las especies del género *Lactobacillus* producen además de las formas isoméricas L (+) y D (-), una mezcla racémica de ambos isómeros (20) (21).

La capacidad fermentativa de diferentes especies de *Lactobacillus* depende del tipo de carbohidrato que desea fermentar: especies como *Lactobacillus delbreuckii* ssp. *delbreuckii* fermentan la sacarosa; por otro lado, otras especies *Lactobacillus delbreuckii* ssp. *bulgaricus* fermentan lactosa; *Lactobacillus helveticus* es capaz de fermentar lactosa y galactosa; especies como *Lactobacillus amylophylus* y *Lactobacillus amylovorus* fermentan almidón; *Lactobacillus lactis* puede fermentar glucosa, sacarosa y galactosa, por ultimo ejemplos tenemos a la *Lactobacillus pentosus* que puede fermentar licores ricos en sulfitos (9) (22).

2.3. COMPONENTES ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS LÁCTICAS

En espacio determinado a menudo el medio ambiente es incapaz de sostener un gran número de organismos en ese espacio, incluso en medios nutritivos ricos, estos trataran de alimentarse y desarrollarse en ese medio, lo que hará que los organismos compitan entre sí por ejemplo: entre animales de la misma o diferentes especies que no permiten a otros invadir su territorio, plantas que producen y liberan al suelo sustancias tóxicas para otras plantas o especies. Los microorganismos también compiten en esta supervivencia del medio, es tanta la abundancia y su comportamiento de dispersión de estos microorganismos que con enorme frecuencia no es una, sino varias especies que invaden un medio altamente nutritivo el cual compiten unas con otras para su supervivencia

muchas de estas segregan sustancias como antibióticos o toxinas al medio para paralizar o causar muerte a otros microorganismos. En este sentido se ha estudiado a las Bacterias Ácido-Lácticas en su acción conservadora, debido a su característica de inhibición de un gran número de microorganismos patógenos y dañinos para la salud. Estas sustancias que se producen incluyen ácidos láctico y acético que contribuyen al sabor, la acidez y la conservación de los alimentos en la fermentación, otra sustancias es peróxido de hidrógeno, que tiene propiedades antimicrobianas, el diacetilo compuesto que contribuye a los sabores y aromas característicos, las bacteriocinas son moléculas peptídicas o proteicas con actividad biológicamente activa y propiedades bactericidas, otros productos secundarios generados por la acción de lactoperoxidasa, que es una enzima que al interactuar con el peróxido de hidrógeno y tiocianato, puede generar productos secundarios con propiedades antimicrobianas adicionales. Las bacteriocinas son moléculas con mayor interés por su acción bactericida sobre receptores específicos de las células bacterianas inhibiendo su crecimiento; además, estas sustancias tienen una composición química muy variada y un mecanismo de acción específico, todas estas características han sido ampliamente investigadas debido por su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* entre otras (23).

La acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por Bacterias Ácido-Lácticas conlleva a la reducción del pH en su entorno, lo que ejerce un efecto inhibitorio de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas entonces en ese sentido, la forma no disociada del ácido láctico puede penetrar con mayor facilidad la pared celular microbiana, especialmente en entornos donde el pH es más alto del contenido celular promoviendo la disociación, liberando iones hidrógeno y el anión correspondiente; de modo que, ambos iones interfieren en el metabolismo e inhiben el crecimiento celular por otro lado cuando el oxígeno está presente; las Bacterias Ácido-Lácticas pueden producir peróxido de hidrógeno, el cual genera radicales hidroxilo que causan peroxidación a los lípidos de la membrana y susceptibilidad de la célula microbiana de muchos microorganismos, además el dióxido de carbono es un subproducto de la fermentación

heteroláctica y en ocasiones se obtiene por descarboxilación de aminoácidos por Bacterias Ácido Lácticas, además el dióxido de carbono promueve un ambiente anaeróbico, ayuda a reducir el pH y puede destruir la integridad de la pared celular microbiana. Por otra parte, el diacetilo es un compuesto producido por Bacterias Ácido-Lácticas durante la fermentación de citrato y es sintetizado en el metabolismo intermediario del piruvato. Se caracteriza por el aroma a mantequilla que estos productos lácticos cultivados producen. (23) (24).

2.4. BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas representan Péptidos antimicrobiales de origen ribosomal que se sintetizan y producen tanto por bacterias gran-negativas y gran-positivas, durante años se ha investigado descubriendo numerosas bacteriocinas obtenidas por microorganismo (Bacterias Ácido Láctica)s, estas bacteriocinas tienen la capacidad de tener espectros de inhibición específicos dirigidos contra ciertos microorganismos, de esta manera se aprovecha en la industria de los alimentos por diversas aplicaciones en distintos procesos. En determinadas circunstancias las bacteriocinas se utilizan para suprimir el crecimiento de bacterias no deseadas; en alimentos, se aplican para inhibir el crecimiento de patógenos específicos, como *listerias*, *Escherichia coli*, *estafilococos* esta aplicación contribuye significativamente a la conservación de seguridad de los alimentos (25).

La mayoría de las bacteriocinas, tienden a tener un espectro de acción limitado, principalmente en bacterias Gram positivo. Sin embargo, algunas bacteriocinas, especialmente ciertos péptidos antimicrobiano pueden presentar un espectro más amplio en contra de algunas bacterias Gram negativas, por lo que existe un marcado interés por estudiar más cepas de Bacteria Ácido-Lácticas, para encontrar estas características (26). Las bacterias del ácido láctico son capaces de producir una amplia gama de sintetizados ribosomalmente proteínas y péptidos que tienen actividad antimicrobiana para competir con otras bacterias de la misma especie "espectro estrecho" o para contrarrestar las bacterias de otros géneros espectro. Las bacteriocinas se clasifican considerando sus propiedades bioquímicas y a sus características genéticas (27) (28) (29).

- **Clase I.** Lantibióticos: Estos son péptidos activos que ejercen su acción en la membrana citoplasmática, se distingue por la presencia aminoácidos poco comunes en sus secuencias proteicas, como *dihidroalanina*, *β-metillantionina* y *lantionina*, esto se forma mediante una alteración posterior a la traducción surge como resultado de la deshidratación de los aminoácidos treonina y serina, a los que posteriormente se añaden átomos de azufre, provenientes de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. La nisina representa un ejemplo característico de bacteriocina perteneciente a esta categoría (30).
- **Clase II.** No lantibióticos. Estas bacteriocinas se distinguen por la presencia de aminoácidos que comúnmente se encuentran en las proteínas, su peso molecular puede variar, y dentro de este grupo se han identificado tres subclases (31).
 - a) Subclase IIa. Se refiere a péptidos con actividad antagonista hacia *Listeria*, comparten una secuencia en la región N-terminal TGNGVXC, Ejemplos representativos de esta categoría incluyen la sakacina P y la pediocina PA-1.
 - b) Subclase IIb: Se refiere a péptidos que inducen la formación de poros en la membrana citoplasmática y están compuestos por dos péptidos distintos. La presencia de ambos péptidos es crucial para lograr una actividad antimicrobiana efectiva. En este grupo se han caracterizado a la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.
 - c) Subclase IIc: Incluye péptidos pequeños no modificados que exhiben termoestabilidad y son transportados mediante péptidos líderes. En esta clasificación solo se han registrado las bacteriocinas, como la divergicina A y la acidocina B.
- **Clase III.** Las bacteriocinas identificadas en esta clasificación incluyen la acidofilicina A, las lacticinas A y B y las helveticinas J y V. Se distinguen por tener un peso molecular a 30 kDa (32).

2.4.1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS DE BAL (BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS)

La gran mayoría de las bacteriocinas producidas por las Bacterias Ácido-Lácticas ejercen su acción inhibitoria sobre el crecimiento bacteriano al inducir la formación de poros en la membrana celular, lo cual comienza con la atracción de las bacteriocinas hacia la bacteria objetivo mediante fuerzas electrostáticas, dicha atracción se origina por la carga positiva de las bacteriocinas que interacciona con los fosfolípidos de la membrana bacteriana los cuales presentan carga negativa. Además, la naturaleza antipática de las bacteriocinas facilita su distribución a lo largo de la superficie de la membrana celular bacteriana (33) (34).

La unión de bacteriocinas con bacterias objetivo se produce a través de interacciones electrostáticas entre la región N-terminal hidrofílica de la bacteriocina y la superficie polar de la membrana celular. Una vez unida la bacteriocina a la bacteria, la región C-terminal hidrofóbica penetra hacia el interior no polar de la membrana celular, los poros formados permiten el paso de moléculas desde el interior de la bacteria hacia el exterior todas estas moléculas incluyen iones K, ATP, aminoácidos y moléculas de bajo peso molecular, estas consecuencias se traducen en la disminución del potencial de membrana y en la escasa disponibilidad de las reservas energéticas de la célula, lo que conlleva a la disminución de la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Estas disminución de la síntesis de proteínas provoca la muerte de la célula (23) (34) (35).

Las bacteriocinas de clase I, como la nisina son péptidos de bajo peso molecular (<5 kDa) que tienen estructura anfipática. Esto significa que tienen una región hidrofílica y una región hidrofóbica. La región hidrofílica de la bacteriocina se une a la superficie polar de la membrana celular de la bacteria diana. La región hidrofóbica de la bacteriocina penetra hacia el interior no polar de la membrana celular. Esta penetración de la región hidrofóbica puede provocar la formación de poros en la membrana celular. Los poros permiten el paso de moléculas desde el interior de la bacteria hacia el exterior. Además de la formación de poros, las bacteriocinas de clase I también puede unirse al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglicano, esta unión impide la formación de la

pared celular, provocando su despolarización y con ello la muerte, por otro lado, las bacteriocinas de clase III, como la lisostafina, son péptidos que actúan directamente en la pared celular de las bacterias diana Gram positivas, la unión de la lisstafina provoca la hidrólisis del enlace beta-1,4 entre las subunidades de peptidoglicano, conduciendo a la lisis de la pared celular conduciendo a la muerte de la bacteria (23) (32) (34) (36).

2.4.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIOCINAS CONTRA PATÓGENOS PRESENTES EN QUESOS

Las Bacterias Ácido-Lácticas pueden producir una amplia gama de compuestos inhibidores para reducir la invasión de patógenos. Estos incluyen Péptidos Antimicrobiales como bacteriocinas, ácidos orgánicos como el ácido láctico, etanol, diacetilo, dióxido de carbono y peróxido de hidrógeno (37).

En la actualidad, los péptidos antimicrobiales como la nisina y pediocina PA-1 (producida por fermentación con *Pediococcus acidilactici*) que son bacteriocinas debido a su capacidad de conservación son atractivas para el uso en la industria de alimentos, resaltando su capacidad para disminuir el conteo de *Staphylococcus aureus* en queso fresco sin afectar las propiedades fisicoquímicas y características sensoriales (38) (39) (40).

El contenido de grasa en el queso puede afectar negativamente la actividad antimicrobiana de la nisina. Esto se debe a que la nisina es una molécula anfipática, lo que significa que tiene una región hidrofílica y una región hidrofóbica. La región hidrofílica se une a la superficie polar de la membrana celular de la bacteria, mientras que la región hidrofóbica penetra hacia el interior no polar de la membrana celular. El contenido de grasa en el queso puede competir con la nisina por los sitios de unión en la membrana celular de la bacteria. Esto puede reducir la cantidad de nisina que puede unirse a la bacteria y, por lo tanto, reduce su actividad antimicrobiana. Sin embargo, el NaCl puede ayudar a aumentar la actividad antimicrobiana de la nisina. Esto se debe a que el NaCl puede ayudar a estabilizar la estructura de la nisina y hacerla menos susceptible a la degradación por los

lípidos. En base a lo anterior, algunos estudios se han enfocado en el desarrollo de estrategias que permitan aumentar la actividad de las bacteriocinas. Una de estas estrategias es la encapsulación de las bacteriocinas. La encapsulación puede ayudar a proteger las bacteriocinas de la degradación por los lípidos y otros factores. Por ejemplo, un estudio encontró que la nisina Z encapsulada en forma de liposomas fue eficiente para inhibir el crecimiento de *Listeria innocua* en queso Cheddar. Otro estudio encontró que la nisina encapsulada en forma de liposomas fue eficiente para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco Minas. Otra estrategia para aumentar la actividad de las bacteriocinas es el uso de tratamientos físicos. Un estudio encontró que el tratamiento con alta presión hidrostática aplicado en quesos para la inactivación de esporas de *Bacillus cereus* fue más eficiente cuando se incluyó nisina como agente antimicrobiano. Estos estudios sugieren que el desarrollo de estrategias para aumentar la actividad de las bacteriocinas puede ser una forma efectiva de controlar el crecimiento de bacterias patógenas en alimentos. (41) (42) (43) (44).

La actividad antimicrobiana de la nisina también ha sido probada en suero de queso. Los resultados de los estudios han sido positivos, mostrando que la nisina es eficaz para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas en el suero de queso. En un estudio, la adición de nisina en la elaboración del queso Feta redujo el conteo de *Listeria monocytogenes* en un 80%. La nisina también modificó la flora microbiana normal del suero, favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas, como los lactobacilos. En otros estudios, se ha reportado que la aplicación de bajas temperaturas, campo eléctrico pulsado y la aplicación de MicroGARDTM (cultivo láctico pasteurizado como bio-protector natural) también favoreció la acción antimicrobiana de la nisina contra *Listeria inocua* en suero de queso. Las bajas temperaturas pueden ayudar a estabilizar la estructura de la nisina y hacerla más efectiva. El campo eléctrico pulsado puede ayudar a permeabilizar la membrana celular de las bacterias, lo que facilita la acción de la nisina. MicroGARDTM es un cultivo láctico pasteurizado que produce bacteriocinas y otras sustancias con propiedades antimicrobianas. Estos estudios sugieren que la nisina es una herramienta prometedora para el control de bacterias patógenas en el suero de queso. La nisina puede ser utilizada

en combinación con otros métodos de conservación, como el frío, el calor o los tratamientos físicos, para mejorar la seguridad y la calidad del suero de queso (45) (46) (47) (48).

Tabla 2: Actividad Antimicrobiana de Bacteriocinas en Quesos (38) (32).

Tratamiento	Bacteriocina	Tipo de queso	Espectro de inhibición
Encapsulación en liposomas	Nisina	Queso fresco Minas	<i>L. monocytogenes</i>
Película polimérica	Enterocina 416K1	Queso fresco y suave	<i>L. monocytogenes</i>
Encapsulación en liposomas	Nisina Z	Queso Cheddar	<i>L. innocua</i>
Bacteriocina libre + calor	Nisina	Queso blanco	<i>L. innocua</i>
Bacteriocina libre	Nisina	Queso Minas	<i>S. aureus</i>
Película de caseinato de sodio	Nisina	Queso	<i>L. innocua</i>
Bacteriocina libre	Nisina	Queso Minas	<i>S. aureus</i>
Ácido caprílico + cinamaldehído	Nisina	Queso fresco Hispano	<i>L. monocytogenes</i>
Grasa + NaCl	Nisina	Queso	<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341
Alta presión hidrostática	Nisina	Queso	<i>B. cereus</i> ATCC 9139

2.4.3. PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS INHIBIDORES

Estos péptidos antimicrobiales llamados bacteriocinas producidas por las BAL (bacterias Ácido-Lácticas) suelen tener una desventaja la cual es carecer de aspectos citotóxicas y

están dotadas de funciones antagónicas, así como de atributos beneficiosos adicionales. Las bacteriocinas de las BAL están emergiendo como una nueva ola de antibióticos con potentes actividades *in vitro* e *in vivo* (49) (50) (51) (52) (53) (54) (55) (56) (57) (58).

A diferencia de los antibióticos tradicionales, las bacteriocinas de las BAL se dirigen a especies específicas y no afectan a otras poblaciones dentro del mismo ecosistema. Se sabe que las bacteriocinas LAB ejercen actividad bacteriostática o bactericida frente a organismos sensibles. Sus modos de acción han sido ampliamente investigados, pero no a fondo (59) (51) (60) (61) (62).

2.5. SUERO LÁCTEO

El suero de leche es un subproducto lácteo con un alto valor nutricional, es una fuente de proteínas de alto valor biológico, vitaminas, minerales y lactosa. Las proteínas del suero de leche son ricas en aminoácidos esenciales, incluyendo triptófano, lisina y aminoácidos azufrados. Estas proteínas tienen una calidad equivalente a las del huevo y no presentan deficiencias en ningún aminoácido, también una buena fuente de minerales, especialmente potasio, calcio, fósforo, sodio y magnesio. También contiene vitaminas del grupo B, ácido ascórbico y lactosa.

Las investigaciones recientes han revelado la diversidad de usos nutricionales del suero de leche. Se ha demostrado que el suero de leche puede ser beneficioso para la salud de los huesos, el sistema inmunológico, el sistema nervioso y la salud digestiva. Algunos ejemplos específicos de los usos nutricionales del suero de leche incluyen a los suplementos nutricionales estos se pueden utilizar para elaborar suplementos nutricionales que pueden ayudar a mejorar la salud y el rendimiento. Los alimentos funcionales se pueden utilizar para elaborar alimentos funcionales que tienen beneficios para la salud. Por ejemplo, el suero de leche se puede utilizar para elaborar yogur, bebidas deportivas y otros alimentos que pueden ayudar a mejorar la salud ósea, el sistema inmunológico o la salud digestiva, se puede utilizar también para elaborar alimentos para bebés que son

nutritivos y fáciles de digerir. El uso del suero de leche es una forma beneficiosa de utilizar este subproducto lácteo. El suero de leche puede ayudar a mejorar la salud y el rendimiento, y puede ser utilizado para elaborar una variedad de alimentos nutritivos (11) (63).

2.5.1. CARACTERÍSTICAS DEL LÁCTOSUERO

El lactosuero es un líquido claro, de color amarillento o ligeramente verdoso translucido, presenta un sabor ligeramente ácido agradable, aunque es el subproducto más abundante que se produce en la industria láctea, sus características lo hace que sea menos rentable en el mercado (64).

2.5.2. TIPOS DE SUEROS

a) Suero Dulce

El suero de leche dulce se obtiene de la producción de quesos mediante el uso de enzimas proteolíticas o cuajo. Las enzimas proteolíticas son proteínas que pueden romper otras proteínas. En la producción de queso, la leche se calienta a una temperatura de entre 15 y 50 grados Celsius. Luego, se agregan las enzimas proteolíticas o los cuajos estos actúan sobre la caseína de la leche, fragmentándolas. Esto hace que las caseínas se desestabilicen y precipiten. La precipitación de las caseínas forma un coágulo de queso. El suero de leche dulce es el líquido que queda después de que se ha formado el coágulo de queso. El suero de leche dulce tiene un pH ligeramente ácido, Esto se debe a que las enzimas proteolíticas o el cuajo también producen ácido láctico (64) (65) (66).

b) Suero Ácido

El suero ácido se genera mediante la precipitación ácida de la caseína. La precipitación ácida de la caseína se logra disminuyendo el pH de la leche a un valor de 4.5 o 4.6. A este pH se alcanza el punto isoeléctrico de la mayoría de las caseínas presentes; en este punto, la carga eléctrica neta de la proteína es igual a cero, lo cual produce que la micela de caseína se desestabilice y precipite, dejando en solución solamente las proteínas de tipo séricas (65) (66).

2.6. COLIFORMES

2.6.1. BACTERIAS COLIFORMES COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL

El grupo de microorganismos coliformes se considera un indicador considerable de contaminación fecal debido a que estos microorganismos viven en el tracto gastrointestinal formando parte del microbiota del lugar, pueden encontrarse tanto en el tracto intestinal del ser humano como de los animales homeotermos. Los microorganismos coliformes comprenden un grupo heterogéneo de amplia diversidad en términos de género y especie. Todos los coliformes pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* (67) (68).

2.6.2. ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli es miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. Es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa con apariencia en forma de bastón, no forma esporas y crece en un rango de pH 4.4 – 6.7, son parte natural de la microbiota intestinal tanto en seres humanos como en animales homeotermos, y representan una de las bacterias anaerobias facultativas más abundantes en el intestino como en la heces fecales estas se excreta diariamente, dentro de las heces podemos encontrar entre 10^8 - 10^9 Unidades Formadoras de Colonias “UFC” g^{-1} de heces, y debido a sus características, es uno de los indicadores de contaminación fecal más utilizados actualmente. Entre las enterobacterias, son la única especie que contiene la enzima β -D-glucuronidasa “GUD”, que degrada el sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónico “MUG”, formando 4- metilumbeliferona. Son bacilos tiene la capacidad de producir indol a partir de triptófano, en 21 ± 3 h a 44 ± 0.5 ° C. Además, poseen la enzima β -D-galactosidasa “GAL”, que reacciona positivamente en el ensayo del rojo de metilo y pueden descarboxilar el ácido L-glutámico, aunque no son capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono o ni crecer en un caldo con cianuro de potasio (69) (70) (67).

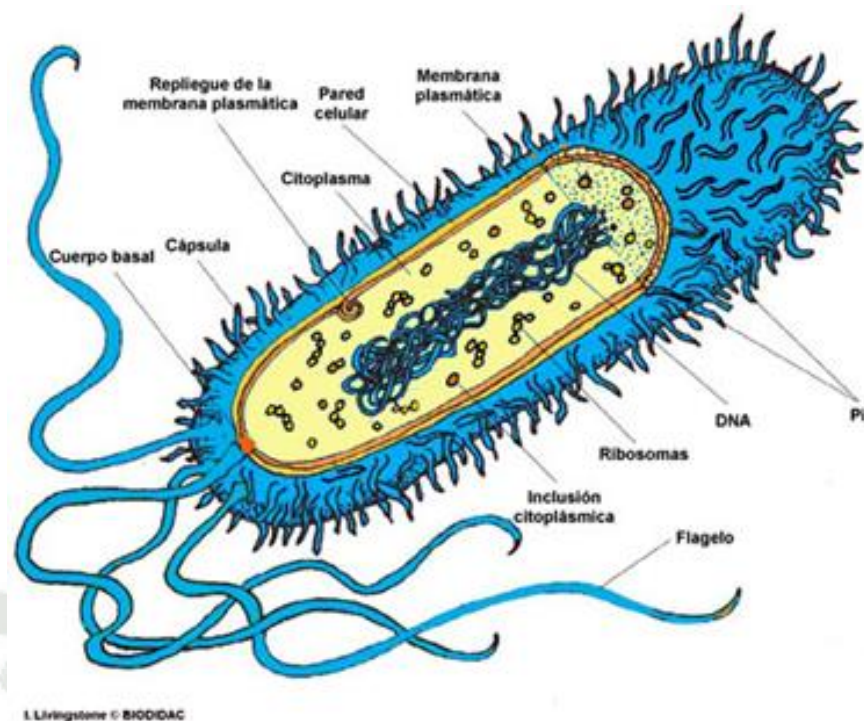


Figura 3. Esquema general de las características y composición de la *Escherichia Coli* (71).

2.6.3. PROBLEMAS RECURRENTE CON LOS COLIFORMES

Uno de los riesgos de que enfrenta la población humana es el consumo de agua contaminada con coliformes fecales y la más común de todas es *Escherichia Coli* que trae consigo infecciones entéricas, diarrea y gases abdominales, aparte esto empeora más por el problema mundial de la resistencia a antibióticos. En nuestro país, Perú existe evidencia de resistencia antimicrobiana en cepas comensales de *Escherichia Coli* en niños proveniente de zonas urbanas o periurbanas tales como en Moyobamba y Urubamba (72) (73) (74) (75).

2.7. APLICACIONES DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

En la industria alimentaria, farmacéutica, química y cosmética se ha investigado una amplia variedad de aplicaciones del ácido láctico, todo este trabajo se enfocó a disminuir los costes de producción a través estudio de nuevos sustratos, nuevas tecnologías de

fermentación y separación que facilitaran la labor en producción y nuevos microorganismos capaces de alcanzar altas concentraciones de ácido láctico, con un alto rendimiento y productividad además de este procedimiento de obtención de ácido láctico producen diferentes derivados como sales, ésteres, calcio y hierro que son ampliamente utilizados en la industria alimenticia como acidulante y conservante, en la industria química como solubilizador y agente controlador de pH, en la industria farmacéutica para producción de drogas, en la industria del plástico se aplica como precursor del ácido poliláctico (APL), en la industria textil ayuda en el teñido e impresión, en la industria agropecuaria se utiliza como acidulante y en la alimentación animal, en las curtiembres es utilizado para remojar los cueros, en la industria de producción de pinturas y resinas, puede ser utilizado como solvente biodegradable entre otros. Todas estas aplicaciones de las Bacterias Ácido Lácticas ha aumentado considerablemente su demanda (22) (76) (77) (78).

Las bacterias del ácido láctico tienen capacidades para modificar el entorno en el que se han entregado, mediante la producción de diferentes metabolitos entre los cuales se encuentra una gran variedad de sustancias inhibidoras e incluso exclusión competitiva. Cabe señalar que los probióticos LAB pertenecen a diferentes especies *Lactobacillus* (Lb.), *Pediococcus* (Ped.), *Lactococcus* (Lc.), *Enterococcus* (Ent.), *Streptococcus* (Str.) y *Leuconostoc* (Leuc.). Sin embargo, las especies de *Lactobacillus* siguen siendo las más estudiadas y utilizadas. Los mecanismos de inhibición de patógenos por BAL-probióticos incluyen (I) producción de compuestos inhibidores, (II) prevención de la adhesión de patógenos, (III) competencia por nutrientes, (IV) modulación del sistema inmunológico del huésped, (V) mejora de la digestibilidad de nutrientes, conversión alimenticia y (VI) reducción de la biodisponibilidad de las toxinas (Figura 4) (79) (80).

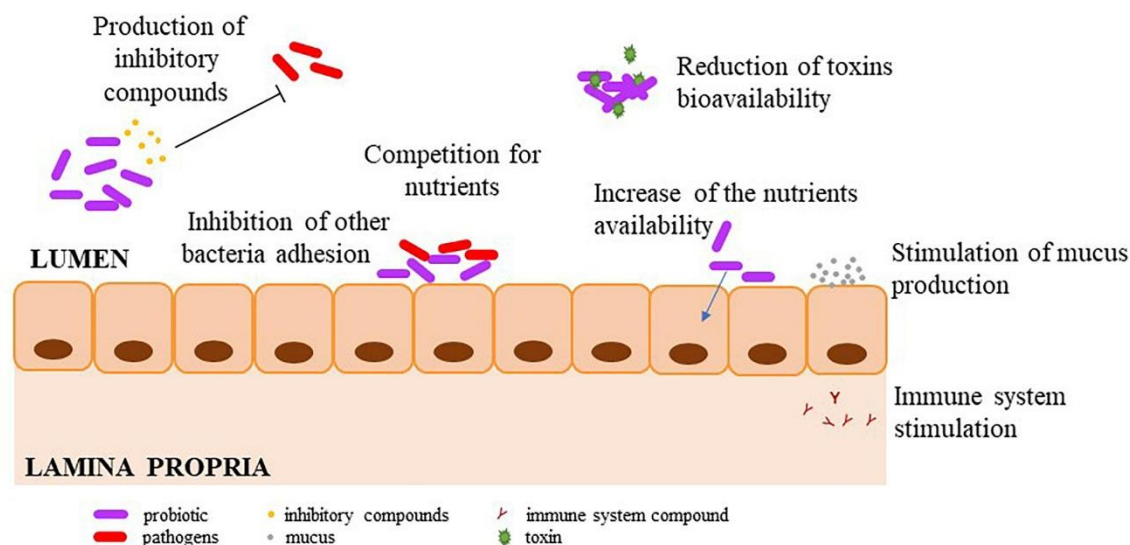


Figura 4. Mecanismos de inhibición de patógenos por BAL-probióticos
(81).

2.7.1. MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE DEL HUÉSPED

Los estudios que se realizaron de las bacterias provenientes del ácido láctico se describen por sus capacidades para mejorar el sistema inmunológico animal, esto afecta positivamente la respuesta inmune innata (propia del animal) y adaptativa al ayudar a proteger de trastornos patógenos. El sistema inmunitario innato induce una defensa inmediata contra la infección, pero también activa una inmunidad adaptativa de larga duración. Los componentes del sistema innato reconocen los patrones moleculares asociados con los patógenos a través de los receptores de reconocimiento de patrones (RRP). El reconocimiento de estos patrones por RRP conduce a la inducción de respuestas inflamatorias y defensas innatas del huésped. Varios tipos de células inmunitarias, incluidos los granulocitos, los macrófagos, las CD y los linfocitos T y B, participan en las respuestas inflamatorias que están mediadas por varias citoquinas como las interleucinas $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$ e $IL-15$. Las respuestas antiinflamatorias/supresoras están mediadas por su parte por $IL-10$, $IL-12$ y $TGF\beta$. Las BAL tienen diferentes propiedades inmunomoduladoras asociadas con sus capacidades para inducir la producción de citoquinas, impactar la inmunomodulación por respuestas inmunes innatas o

adaptativas. Esas habilidades de inmunomodulación se consideran un criterio crucial para la evaluación de probióticos, a través de varios mecanismos (82) (83) (84) (85) (86) (87) (88) (86).

2.7.2. MEJORA DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA

Se ha demostrado que las cepas probióticas tienen efectos beneficiosos relacionados con la función nutricional del epitelio intestinal. También mejoran la función de barrera intestinal al estimular: (i) la producción de moco antimicrobiano y péptido como las defensinas, (II) el aumento de las respuestas inmunitarias, (III) la expresión y/o localizaciones mejoradas de las proteínas de unión estrecha, (IV) la prevención de la apoptosis de las células epiteliales y (V) la inducción de moléculas cito protectoras. En pollitos, *Lb. plantarum* LTC-113 (1×10^9 CFU) puede regular las uniones celulares para impedir la colonización de patógenos como *Salmonella* (89) (90) (91) (92) (93) (94).

Además, otros componentes celulares del sistema inmunitario innato, como los monocitos y los macrófagos, previenen la invasión de patógenos al secretar citoquinas proinflamatorias y moléculas citotóxicas. Las células Natural Killer (NK) producen citocinas como el interferón (IFN- γ) y diversas interleucinas (IL): IL-10, IL-3, etc. En lechones al destete, la administración de *Lb. brevis* ZLB004 (2×10^9 CFU/kg) de alimento aumentó el nivel de IFN- γ . Cepas de lactobacilos como *L. fermento*, *L. salivario*, *L. crispatus* y *L. gasserise* ha informado que modulan positivamente el nivel de secreción de las interleucinas pro y antiinflamatorias IL-6, IL-8 e IL-10 para regular la inflamación y restaurar el equilibrio fisiológico de los animales productores de alimentos. La cepa de *L. acidophilus* estimuló las propiedades antiinflamatorias en lechones infectados con *E. coli enterotoxigénica* (ETEC) cuando se administró a 1×10^8 UFC en la alimentación. Esta cepa también fue capaz de regular a la baja las citocinas proinflamatorias IL-8 y TNF- α in vivo según los experimentos con animales. La misma tendencia en los niveles de IL-8 también se observó en carpas infectadas con *Aeromonas hydrophila* (*Cyprinus carpio Huanghe* var.) cuando se alimentaron con 1×10^7 CFU g/L *L. delbrueckii*. Por el contrario, la combinación a 1×10^7 CFU cada uno/g de gránulos de alimentación de *Lactococcus lactis* BFE920 y *L. plantarum* FGL0001 indujo un

aumento de IL-8 e IL-6 en peces lenguado japonés infectados con *Streptococcus iniae* y sostienen que las discrepancias en los efectos de inmunomodulación se atribuyeron a las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas, su dosis y también a las condiciones de los animales establecieron que *L. delbrueckii* a 1×10^7 UFC g/L aumentó los niveles de citocinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- β en el intestino y mejoró la inmunidad de *Cyprinus carpio Huanghe* var. Infectado con *A. hydrophila* (95) (96) (62) (97) (98) (99) (100) (101) (102) (103).

2.7.3. MEJORA DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

La respuesta inmunitaria adaptativa depende de los linfocitos B y T, que inducen una respuesta específica de antígeno. Asociación de *L. plantarum* (1×10^7 CFU/kg de alimento) y *Clostridium butyricum* (1×10^6 CFU/kg de alimento) sobre el rendimiento productivo y la función inmunológica en pollos de engorde reveló el aumento de los niveles de IgG e IgA en pollos alimentados con estos probióticos beneficiosos. La cepa, *L. plantarum* B2984 demostró estimular la producción de inmunoglobulinas (IgM e IgA) contra la infección por *Salmonella* en cerdos durante ensayos con animales expuestos por vía oral. La alimentación de lechones con una cepa de *L. ramnoso* ATCC 7469, a una concentración de 10^9 CFU/mL, previno la diarrea infecciosa aguda al estimular el sistema inmunitario adaptativo para producir posteriormente un aumento en la concentración de células T CD3 + CD4 + CD8 - de la lámina propia. En pollo, suplementar el alimento con 1×10^9 UFC/kg de *L. acidophilus* LA5 aumentó la producción de células T CD4 +, CD8 + y TCR1 + en el tracto GI, pero también en la sangre periférica. La administración de 10^{10} UFC/mL *Lactobacillus* spp. Podría activar eficientemente la inmunidad de la mucosa en pollos al aumentar los niveles de IgA e IgG. En terneros jóvenes, se ha demostrado que la administración de $1,85 \times 10^7$ CFU/L de especies de *Lactobacillus* mejora la ganancia de peso y la inmunocompetencia. En resumen, se informó que las BAL mejoran la resistencia del huésped y el rendimiento de la producción, como se describe en la sección "Rendimiento de la producción", al mejorar la respuesta inmunitaria (104) (105) (106) (107) (108) (109).

2.7.4. MEJORA DE LA DIGESTIBILIDAD DE LOS NUTRIENTES Y CONVERSIÓN ALIMENTICIA

La digestibilidad del alimento refleja la cantidad de alimento absorbido y la disponibilidad de nutrientes utilizados para el crecimiento y reproducción animal. Los probióticos BAL mejoraron la digestibilidad de los nutrientes debido a sus actividades altamente fermentativas. De hecho, pueden mejorar todo el proceso digestivo, la utilización metabólica de nutrientes y mejorar la eficiencia del alimento mediante la producción de enzimas digestivas (p. ej., amilasas, quitinasas, lipasas, fitasas, proteasas) o simplemente generando ácidos grasos volátiles y vitaminas B: riboflavina, biotina, vitamina B12. Además, los probióticos-BAL pueden modificar indirectamente el microsistema intestinal ayudando en la asimilación de nutrientes a través de la activación de las células inmunitarias del huésped y aumentando la cantidad de anticuerpos que conducen a una mejora del bienestar animal (110) (111) (37) (112) (113) (114).

2.7.5. REDUCCIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE TOXINAS

Los efectos protectores de los probióticos de las BAL pueden resultar en la inhibición de la expresión de toxinas en los patógenos. También se informó que las BAL pueden constituir barreras naturales contra las micotoxinas consideradas como compuestos potencialmente dañinos para los animales. Varios investigadores informaron que *L. plantarum*, *L. acidófilo*, *L. paracasei* y *Ent. faecium* podría mitigar el efecto de las aflatoxinas para mejorar la salud humana y animal (37) (83) (115) (116) (117) (118) (99).

Estos microorganismos actúan como una barrera biológica en el tracto intestinal, disminuyendo la disponibilidad de micotoxinas ingeridas y neutralizando sus efectos adversos. Las capacidades desintoxicantes de las BAL están asociadas con sus capacidades para unir y secuestrar micotoxinas, lo que aumenta su excreción por el sistema digestivo en las heces. Las micotoxinas pueden unirse a la superficie bacteriana viable y no viable mediante la adhesión a sus componentes de la pared celular, y la aflatoxina B1 (AFB1), por ejemplo, se unió a las BAL mediante interacciones no covalentes. Se han realizado pruebas encaminadas al control de micotoxinas con *L. casei* DSM20011, *L. casei* Shirota, *L. rhamnosus* LGG y LC 705,

Lb. acidophilus 24, y *L. plantarum* *L. breve*, *L. sanfranciscensis*, en las cuales sugirieron que la unión a las micotoxinas, particularmente a la ocratoxina, se atribuyó a las propiedades hidrofóbicas de la pared celular, y también a las interacciones donador-aceptor de electrones y ácido-base de Lewis. Las BAL tienen mecanismos antimicotoxinas adicionales basados en un estudio realizado en ratones en los que la dieta se complementó con *L. plantarum* C88 (1×10^{10} UFC/mL). Esta suplementación debilitó el estrés oxidativo inducido por la aflatoxina AFB₁. Asimismo, esta cepa disminuyó la peroxidación lipídica en suero e hígado debido al daño hepático causado por la toxicidad de AFB₁. Las LAB producen exopolisacáridos, que son compuestos importantes capaces de inhibir las toxinas bacterianas para las interacciones entre *L. rhamnosus* GG contra *Bacillus cereus*. Se han informado otros mecanismos que incluyen la disminución del pH y el bloqueo de QS durante la coexistencia de *C. perfringens* tipo A y BAL, particularmente *L. acidophilus* CGMCC 11878 y *L. fermentum* CGMCC12029 (119) (120) (121) (122) (123) (124) (125) (126) (127).



CAPITULO III

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. *Muestras y/o unidades biológicas:*

- Heces de animal bovino.
- Lactosuero proveniente de la Asociación de Productores Agropecuarios Majes – ASPAM.

3.1.2. *Material de laboratorio:*

- Guantes.
- Asa de Kohle.
- Matraz de 100 ml.
- Bureta.
- Frascos de laboratorio.
- Micropipeta de 1000 ul.
- Micropipeta de 5 - 50 ul.
- Puntas.
- Probeta.
- Mechero.
- Placas Petri
- Tubos de Ensayo
- Tubos Falcón.

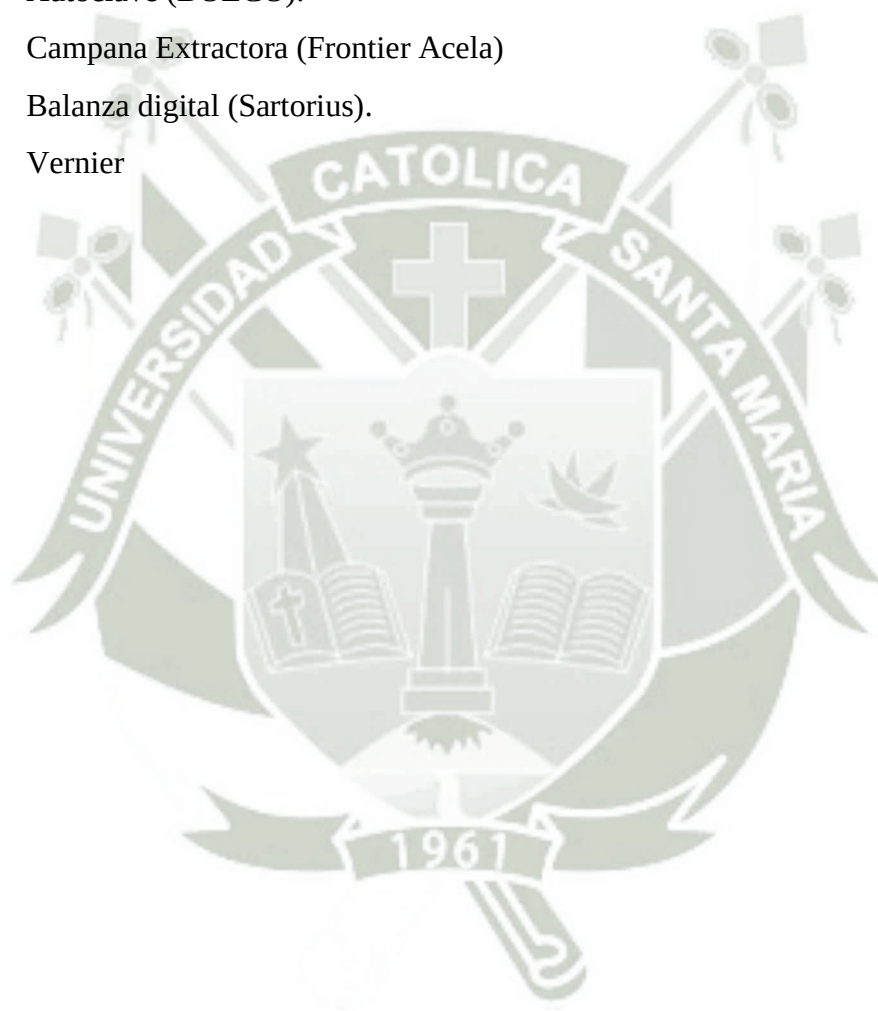
3.1.3. *Insumos y reactivos químicos:*

- Agua destilada.
- Agar M.R.S Agar Man, Rogosa y Sharpe (Pronadisa).
- Agar Mac Conkey.
- Agar Mac Conkey Sorbitol. (HIMEDIA)
- Agar Muller Hinton

- Batería de Tinción Gram
- Agar T.S.I.
- Azul de tetrazolio

3.1.4. Equipos e instrumentación:

- Incubadora (BIOBASE).
- Autoclave (BOECO).
- Campana Extractora (Frontier Acela)
- Balanza digital (Sartorius).
- Vernier



3.2. METODOLOGÍA.

3.2.1. DETERMINAR LA IDENTIDAD TAXONOMICA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROVENIENTES DE LACTOSUERO RESIDUAL.

Para determinar la identidad taxonómica se caracterizaron las colonias provenientes del lactosuero, aisladas en agar MRS, se realizaron pruebas de catalasa, resistencia a pH, resistencia a diferentes temperaturas, coloración de Gram y pruebas bioquímicas convencionales descritas en el siguiente flujograma.

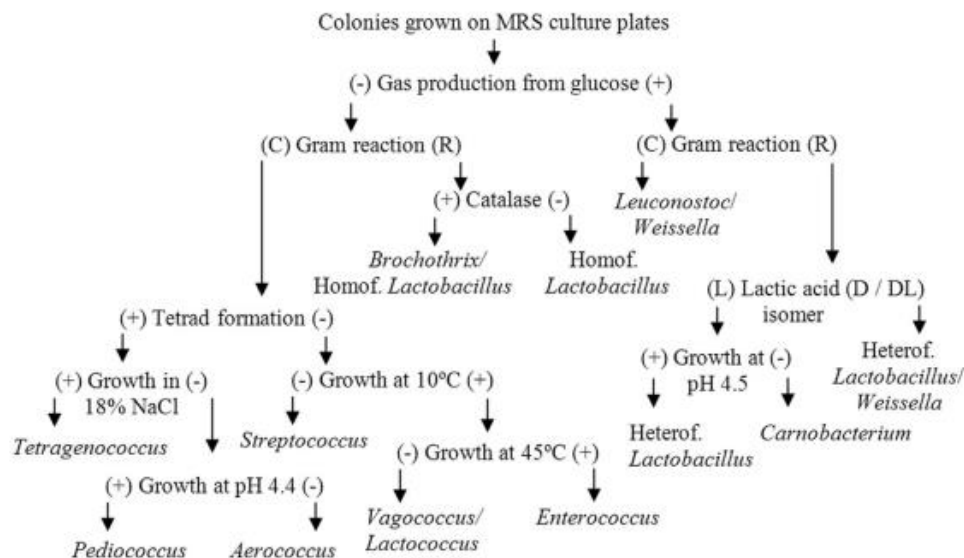


Figura 5: Diagrama de flujo para la identificación de géneros de Bacterias Ácido-Lácticas por características fenotípicas. C: cocos; R: varillas; (-): negativo; (+): positivo; L, D y DL: isómeros (128).

3.2.1.1. Aislamiento de las Bacterias Ácido-Lácticas de lactosuero residual

Antes de tomar de la muestra de suero de leche se deberá asegurar la disponibilidad de todos los equipos, materiales y reactivos que se utilizarán, tanto los equipos e instrumentos que se utilizará en el procedimiento de muestreo, tantos los instrumentos como el procedimiento tienen que estar en condiciones de limpieza, sin

partículas húmedas y esterilización antes de proceder a la toma de la muestra destinada al análisis fisicoquímicos y microbiológicos.

Para esterilizar se debe usar uno de los métodos siguientes:

- Esterilización por medio de secado a la estufa a una temperatura de 175 ° C, durante mínimo 30 minutos.
- Esterilización por medio de la utilización de la autoclave a 121 ° C de temperatura, 15 lbs de presión por 15 minutos.
- Para la esterilización del material se sumergirá en una solución de etanol al 70% (v/v).
- Flameando a llama directa del mechero buchner las superficies que tendrán contacto las muestras.
- Ignición con etanol de 96% (v/v) de las superficies que tendrán contacto con las muestras.
- Sumergiendo los materiales en una solución desinfectante de amonio cuaternario.

La selección del método de esterilización dependerá de las características como la forma y tamaño del instrumento, así como en las condiciones de la toma de la muestra. No se guardarán materiales esterilizados por periodos superiores a dos semanas, transcurrido este tiempo se deberá someter nuevamente a esterilización antes de su uso (129).

Se realizó la recolección del suero de leche proveniente de la Asociación de Productores Agropecuarios Majes – ASPAM. Considerando que las muestras de lactosuero pueden contaminarse mediante corrientes de aire, fumar, hablar mientras se realice este proceso, por ello se debe evitar en lo más mínimo estos incidentes. La recolección de la muestra de lactosuero se dio en frascos limpios y/o esterilizados de borosilicato el cual fueron cerrados herméticamente para evitar la contaminación por último los frascos fueron etiquetados, rotulados o marcados con la identificación de la muestra. Posteriormente se mantuvo las muestras refrigeradas a una temperatura entre (2 a 8) °C hasta la llegada al laboratorio, las muestras no deben congelarse

porque de ser así los microorganismos sufriría una ruptura celular por las bajas temperaturas y se perdería la muestra.

Posterior a la toma de muestra, en el laboratorio se aisló las bacterias Ácido-Lácticas, se agregó 50 ml de muestra de lactosuero en un matraz de 250 mL, el cual fue incubado a 37 °C por 48 horas, en un tubo de ensayo de 100 mL con medio MRS líquido se inocularon 1 mL de la muestra de lactosuero incubada y se llevó a incubar en ambiente anaeróbico por 48 horas. Posteriormente los microorganismos se sembraron en placas con agar MRS extendiéndolo con un asa de khole por estría sobre la superficie del agar luego las placas se sellaron con parafilm para evitar su contaminación e incubaron a 35 °C en una atmósfera anaeróbica, durante 48 horas (130) (131).

Finalmente se identifican los microorganismos que crecieron en las placas observando su morfología y posteriormente, cada microorganismo, que se identificó, se aisló en diferentes placas con Agar MRS para que crezcan independientemente y así poder repicar hasta tener una cepa pura.

3.2.1.2. Crecimiento de colonias en Agar M.R.S.

El medio de cultivo M.R.S fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe, la cual por su formulación permite el adecuado desarrollo de lactobacilos y otras bacterias ácido-lácticas a partir de muestras clínicas y alimentos (especialmente productos lácteos) es por ello que se utilizó para el aislamiento identificación de Bacterias Ácido-Lácticas nativas del lactosuero (132).

3.2.1.3. Fermentación de glucosa para la producción de gas.

Se preparó medio T.S.I. donde su única fuente de carbohidratos fuera la glucosa y se realizó en tubos de ensayo donde el medio estaría en forma inclinada, se sembró y tapó con un algodón y gasa los tubos de ensayo para que no salga el gas que se

producirá en la fermentación del medio si el agar se rompe en el tubo de ensayo entonces el microorganismo será positivo a producción de gas.

3.2.1.4. Identificación macroscópica y microscópica de los microorganismos aislados.

Primero se identificó a las colonias aisladas en medio M.R.S según su forma, a simple vista se seleccionó las colonias que se diferenciaban una de otras, repico cada colonia por separado en medios M.R.S. Para poder identificar la forma y estructura de cada microorganismo aislado en los medios M.R.S se realizó una tinción gram, la cual cada muestra se colocó en un portaobjetos limpio agregando una gota de agua destilada, posteriormente se tomó una parte de una colonia de muestra a analizar con la ayuda de un asa de siembra, mezclando con la gota de agua destilada, dejando secar y fijando con la flama de un mechero. Se cubrió con la solución de cristal violeta durante 1 min, hasta que se seque el colorante y lavar ligeramente con agua, posteriormente se aplicó la solución de yodo durante 1 minutos, se desechó y lavó con agua. Con el portaobjetos inclinado, se agregó gota a gota la solución de alcohol-cetona y se mantuvo por unos segundos, se lavó con agua. Por último, cubrir con safranina durante 10 a 20 segundos. Desechar el colorante y lavar con agua. Posteriormente se podrá observar la forma del microorganismos que se identificó (133).

3.2.1.5. Crecimiento a temperaturas de 10 °C y 45 °C.

Cada especie o cepa de bacterias tiene una temperatura basal diferente, por lo que la temperatura optima de una bacteria puede ser más alta que la temperatura máxima de otra bacteria o inferior a la temperatura mínima de una tercera bacteria. Dependiendo del rango de temperatura en el que puedan crecer las diferentes Bacterias. Se cultivó bacterias en medio M.R.S. en una incubadora, a temperaturas 10 °C y 45 °C.

3.2.1.6. Prueba para saber el tipo de isómero del Ácido Láctico producido por una bacteria acido-láctica

Las bacterias lácticas fueron caracterizadas por la producción de diferentes isómeros del ácido láctico mediante la fermentación de la glucosa, este tipo de bacterias pueden producir ácido láctico L (+) o D (-), o la mezcla racémica de ambos DL. La determinación de isómeros del ácido láctico se realizó siguiendo la metodología basada en una reacción de óxido-reducción enzimática estereoespecífica catalizada por la enzima lactato-deshidrogenasa, esta enzima oxida el lactato en piruvato reduciendo simultáneamente el isómero L (+) a D (-) a una forma NAD (NADH), produciendo una reacción de acople pues reduce el azul de tetrazolio en presencia de diaforasa. El azul de tetrazolium es una sal que se reduce formando un compuesto insoluble azulado entonces con este método, utilizando el D (-) es posible diferenciar las cepas productoras de ácido láctico D (-) de las que producen los dos tipos de ácido láctico (DL) por la aparición de un halo azulado más intenso; las cepas productoras exclusivamente del isómero L (+) se distinguen por la ausencia de color (134).

3.2.1.7. Tolerancia a pH 4.5.

Se sembraron en medio M.R.S. ajustado con HCl 1 N a un pH de 4.5 para ver si el microorganismo crecía en un ambiente de pH bajos.

3.2.2. SUSTANCIAS INHIBITORIAS SIMILARES A LAS BACTERIOCINAS EVALUANDO EL EFECTO INHIBITORIO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS NATIVAS DEL LACTOSUERO SOBRE *ESCHERICHIA COLI*.

El ensayo de difusión en disco en agar se utilizó para detectar cepas de Bacterias Ácido-Lácticas productoras de SISB sustancias inhibidoras similares a bacteriocinas. La cepa indicadora fue una coliforme fecal, específicamente la *Escherichia coli* la cual se aisló de estiércol bovino en Agar E.M.B. durante 24 h a 37 °C se repico en Agar MacConkey Sorbitol específico para *Escherichia Coli* durante 24 h a 37 °C. La densidad microbiana de cada cepa indicadora se ajustó a 10⁷ UFC/ml y cultivadas en placas de agar Mueller Hinton (AMH).

Cada una de las 3 cepas provenientes de lactosuero residual, previamente identificada como Bacterias ácido-lácticas, se cultivaron en caldo M.R.S. durante 24 h en condiciones anaeróbicas a 37 °C. Se tomó 10 mL de la alícuota del caldo y se llevó a pH 3.5 con ácido clorhídrico a 5N para evitar la adsorción de moléculas y calentar a 78 °C en baño maría por 5 minutos con el fin de Inactivar las proteasas, posteriormente se filtró a través de membranas de filtro de poro de 0,22 µm. La alícuota filtrada se centrifugó a 3500 rpm a 4 °C por 3 minutos para liberar de células luego se traspasó a otro falcón y se ajustó a pH 6 utilizando NaOH 1,0 N por último para eliminar el peróxido se trató con 1 mg/mL un tratamiento con catalasa (Sigma-Aldrich) a 37 °C por dos horas para eliminar la posible acción inhibitoria de H₂O₂. Los discos de papel filtro de 9 mm de diámetro se colocaron en cada placa de agar sembrada con la cepa indicadora (*Escherichia Coli*). En cada disco, se añadieron 60 µL del Sobrenadante libre de células (SLC) neutralizado tratado con catalasa de un aislado de Bacteria Acido-Láctica aislada del lactosuero, y las placas se incubaron durante 12 h a 37 °C en condiciones 37 % de humedad disponible, si se ve la formación de halos de inhibición es que la bacteria que se hizo la prueba es productora de SISB sustancias inhibidoras similares a bacteriocinas (135) (136).

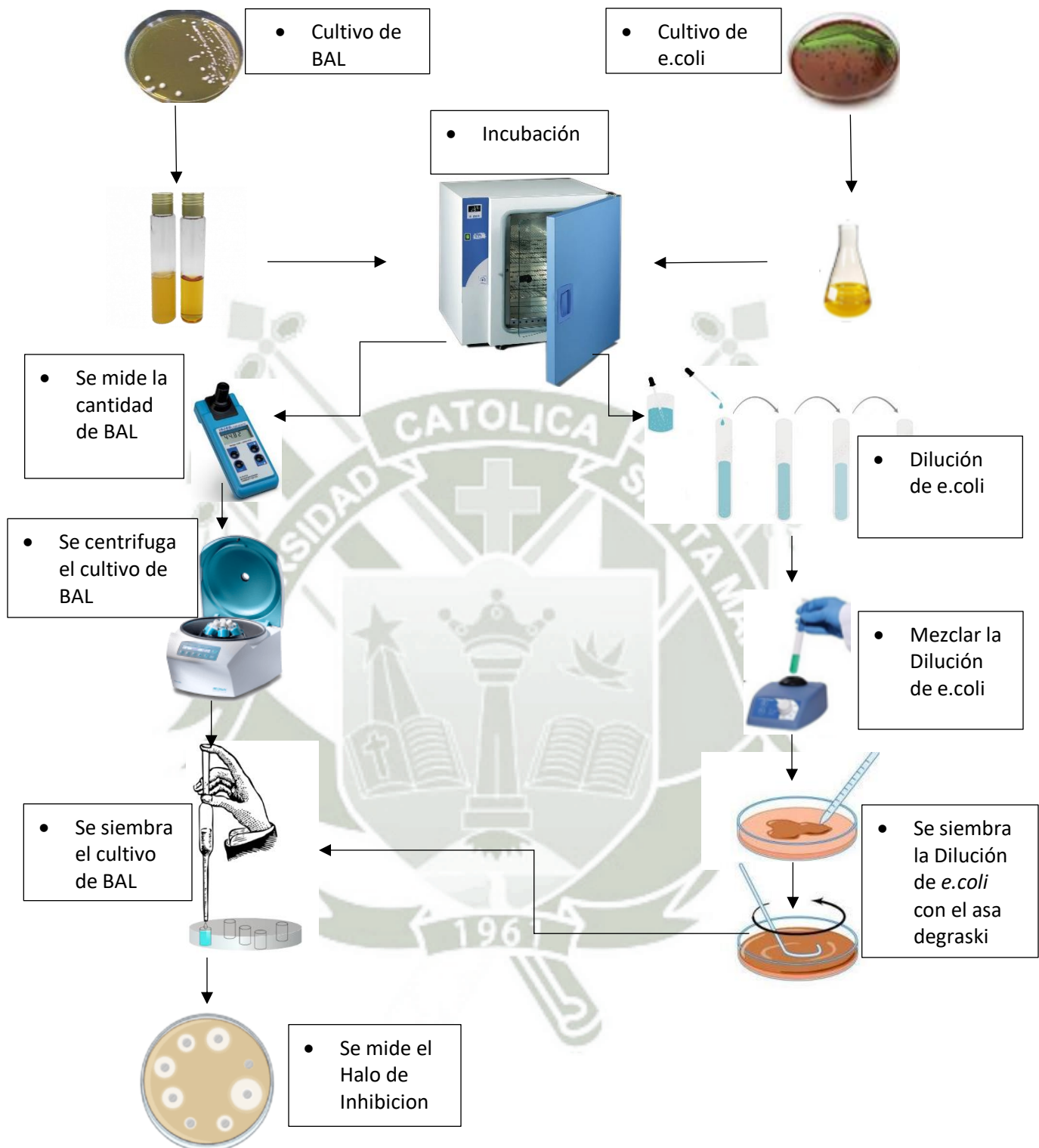


Figura 6: Flujograma del proceso obtención de suero libre de células de las BAL y el ensayo de difusión en disco de agar se utilizó para detectar cepas de Bacterias Acido-Lácticas productoras de sustancias inhibitoras similares a bacteriocinas.

3.2.3. DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LAS SUSTANCIAS INHIBITORIAS SIMILARES A LAS BACTERIOCINAS PROVENIENTES DE LAS BACTERIAS ACIDOLACTICAS NATIVAS SOBRE ESCHERICHIA COLI.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de las bacterias las cuales se pudo detectar que son productoras de SISB Sustancias Inhibitorias Similares a las Bacteriocinas se realizaron la misma prueba de ensayo de difusión en disco en agar. La cepa indicadora fue una coliforme fecal, específicamente la *Escherichia coli* la cual se aisló de estiércol bovino en Agar E.M.B. durante 24 h a 37 °C se repico en Agar MacConkey Sorbitol específico para *Escherichia Coli* durante 24 h a 37 °C. La densidad microbiana de cada cepa indicadora se ajustó a 107 UFC/ml y cultivadas en placas de agar Mueller Hinton (AMH).

Las cepas de Bacterias Ácido-Lácticas previamente identificadas como productoras de SISB Sustancias Inhibitorias Similares a las Bacteriocinas se cultivaron en caldo M.R.S. durante 24 h en condiciones anaeróbicas a 37 °C. Se tomó 10 mL de la alícuota del caldo y se llevó a pH 3.5 con ácido clorhídrico a 5N para evitar la adsorción de moléculas y calentar a 78 °C en baño maría por 5 minutos con el fin de Inactivar las proteasas, posteriormente se filtró a través de membranas de filtro de poro de 0,22 µm. La alícuota filtrada se centrifugó a 3500 rpm a 4 °C por 3 minutos para liberar las células luego se traspasó a otro falcón y se ajustó a pH 6 utilizando NaOH 1,0 N para volver a pH neutro, se trató con 1 mg/mL un tratamiento con catalasa (Sigma-Aldrich) a 37 °C por dos horas para eliminar la posible acción inhibitoria de H₂O₂.

Se hizo diluciones seriadas a 1/10 de la muestra diluyendo con suero fisiológico tomando 1 mL de la muestra depositándolo en un tubo de ensayo y se lleva a un volumen de 10 mL con suero fisiológico, esta acción se hará lo mismo en diferentes tubos de ensayo por lo menos 3 veces más hasta tener

5 tubos de ensayos con concentraciones al 100 % y 4 diferentes concentraciones diluidas, como se muestra en la tabla 3.

Los discos de papel filtro de 9 mm de diámetro se perforaron en cada placa de agar sembrada con la cepa indicadora (*Escherichia Coli*). En cada disco de papel filtro, se añadieron 60 µL con la solución respectivamente diluida de Sobrenadante libre de células (SLC) de un aislado de Bacteria Ácido-Láctica aislada del lactosuero, y las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C en condiciones 37 % de humedad disponible y 0.5 CO₂ disponible, esta actividad se hará por triplicado dependiendo de la dilución que se hizo previamente con la solución de sobrenadante libre de células (véase tabla 3 para más detalle). La zona de inhibición (ZI) producida por las cepas de BAL se midió en mm con un vernier, las cepas que mostraron resultados positivos (ZI) se consideraron productoras de Sustancias Inhibidora similar a Bacteriocina SISB (135) (136).

La actividad de las sustancias inhibidoras similares a las bacteriocinas (SISB) se determinó mediante el ensayo de difusión de disco de agar utilizando sobrenadantes de cultivo libre de células. Las alícuotas de los sobrenadantes se colocaron en discos de papel filtro (9 mm de diámetro) en placas de agar Müller Hinton enfriado (15 ml) previamente sembradas con un coliforme fecal que es la *Escherichia coli* O157:H7 (107 UFC/ml) en crecimiento activo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 8 horas para el crecimiento de los microorganismos. A las 8 horas se midieron los diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento y se definió la actividad antimicrobiana de sustancias inhibidoras similares a las bacteriocinas (SISB) como AU (expresada en mm²/mL), que es la unidad de área de la zona de inhibición por unidad de volumen. La actividad de las sustancias inhibidoras similares a las bacteriocinas (SISB) se calculó utilizando la ecuación: (137).

$$\text{Actividad (SISB)} = \left(\frac{\text{mm}^2}{\text{mL}} \right) = \frac{L_z - L_s}{V}$$

Donde;

$$Lz = \text{área de zona libre (mm}^2\text{)}$$

$$Ls = \text{área del disco (mm}^2\text{)}$$

$$V = \text{volumen de muestra (mL)}$$

Tabla 3. En la siguiente tabla de Diluciones seriadas que se utilizó para la prueba del efecto Inhibidor de las bacterias ácido-lácticas sobre *e.coli* se puede notar como desde el recipiente Madre se mezcla con el tubo 1 y luego del tubo 1 al tubo 2 y así consecutivamente hasta llegar a la solución que se necesite.

	Cantidad de solución madre	Cantidad de suero fisiológico	Dilución Obtenida	Porcentaje de concentración
Recipiente madre	10	0 ml	0	100 %
Tubo de ensayo 1	1 mL	9 mL	1/10	1/10 de 100% = 10%
Tubo de ensayo 2	1 mL	9 mL	1/100	1/100 de 100% = 1%
Tubo de ensayo 3	1 mL	9 mL	1/1000	1/1000 de 100% = 0.1%
Tubo de ensayo 4	1 mL	9 mL	1/10000	1/1000 de 100% = 0.01%



CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINAR LA IDENTIDAD TAXONOMICA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROVENIENTES DE LACTOSUERO RESIDUAL.

4.1.1. AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE LACTOSUERO RESIDUAL

El agar M.R.S. se utiliza como medio de cultivo sólido selectivo, utilizado para el aislamiento y recuento de bacterias ácido lácticas, especialmente del género *Lactobacillus*, siendo específico para este propósito (132).

Transcurrido una semana del crecimiento del cultivo a 37 ° C se observaron colonias como en la figura 6, de las cuales se aisló 3 cultivos en placas de Agar M.R.S, las que se nombraron con el rótulo de "L1, L2 y L3", los cultivos se diferenciaron a simple vista, según sus características macroscópicas. Las colonias aisladas presentaron características macroscópicas más pequeñas convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos descritas por Boone et al 2001 (7) con respecto a las colonias que presentaban tamaños más grandes y forma de ovoide en forma de limón, piriforme, cilíndrica, triangular, e incluso alargada formando un verdadero micelio pertenecientes al género de las levaduras. Luego de su incubación a las 48 horas se realizó sus respectivas pruebas macroscópicas y microscópicas para poder verificar la especie de bacteria que se encontraba en la muestra de suero láctico.

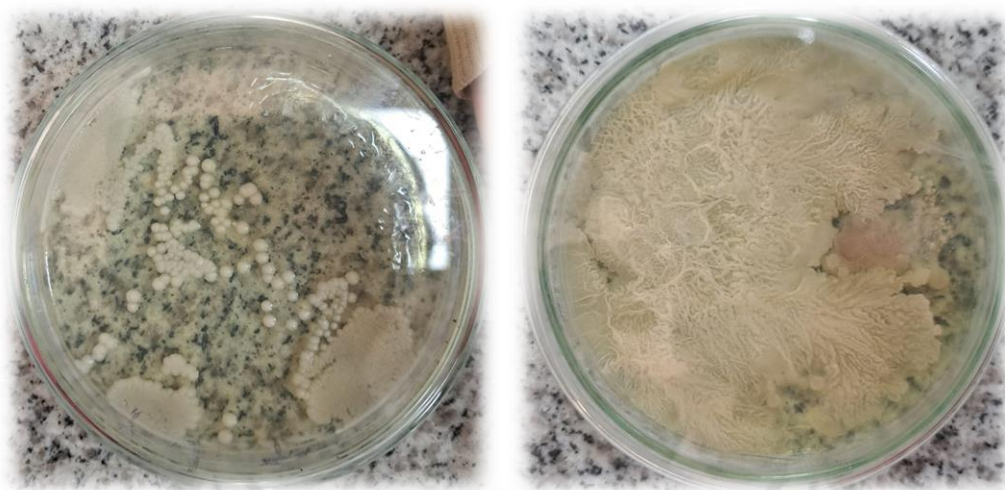


Figura 7. Colonias observadas en el cultivo de agar MRS.

4.1.2. PRUEBAS MACROSCÓPICAS

Cada colonia fue aislada en medios M.R.S. por separado, hasta tener una cepa pura de cada colonia, se observaron sus características macroscópicas a simple vista de 3 colonias diferentes:



Figura 8. En el cultivo de la muestra L1 se observan colonias pequeñas y esparcidas por el medio por estría, lisas de borde uniforme, de color crema, blanco u opacos.



Figura 9. En el cultivo de la muestra L2 se observan colonias grandes y esparcidas por el medio por estría, papilada, rizoide y de borde redondeado, de color blanco.

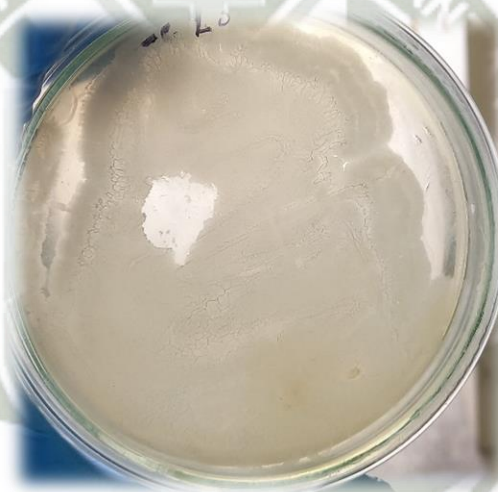


Figura 10. En el cultivo de la muestra L3 se observan colonias grandes y esparcidas por el medio por estría, planoconvexa, rizoide y de borde ondulado, de color blanco cremoso y beige.

Durante la incubación de las cepas en medio sólido M.R.S. (Man, Rogosa y Sharpe) se pudo observar el crecimiento de las cepas según la estría que se hizo en la placa, cuyas características macro morfológicas eran semejantes a las bacterias ácido lácticas, todas estas características descritas por G, Boone et en su libro *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology* (9).

4.1.3. PRUEBAS MICROSCOPICAS

4.1.3.1. TINCIÓN GRAM

Se realizó una tinción Gram en las 3 cepas provenientes de lactosuero que se aislaron en Agar M.R.S y posteriormente se purificaron, las cuales se observaron en un microscopio. Las 3 bacterias se presentaron como bacilos y cocos Gram-positivos, de borde redondeado, con una disposición en cadena o individuales. Las características morfológicas evidenciadas en microscopio, fueron reportadas como propias del grupo de BAL descritas por G, Boone et en su libro *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology* (9).

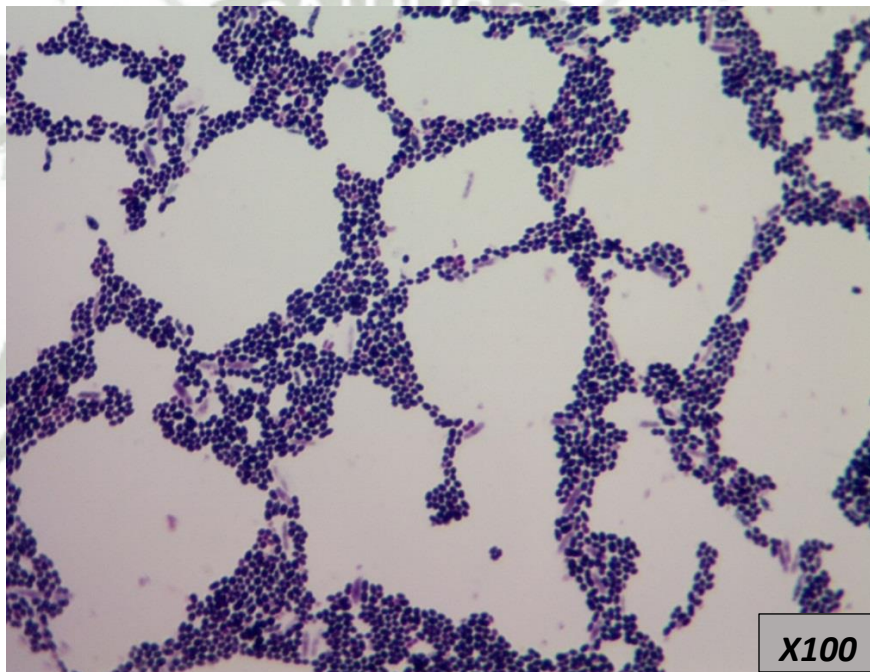


Figura 11. En el cultivo de la muestra L1 se observaron pequeños Cocos, Gram positivo de una de las cepas aisladas del lacto suero residual.

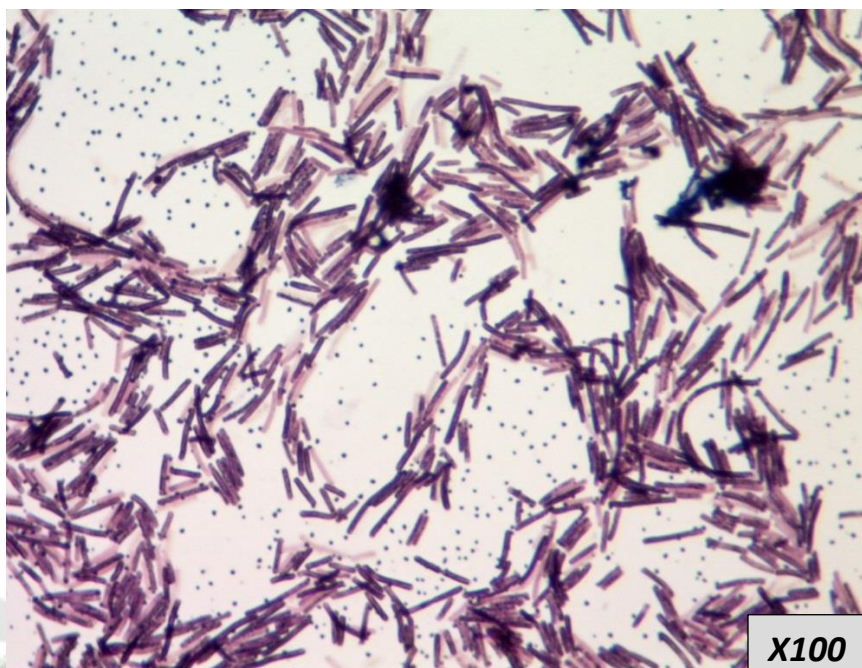


Figura 12. En el cultivo de la muestra L2 se observaron bacilos largos, Gram positivo de una de las cepas aisladas del lacto suero residual.

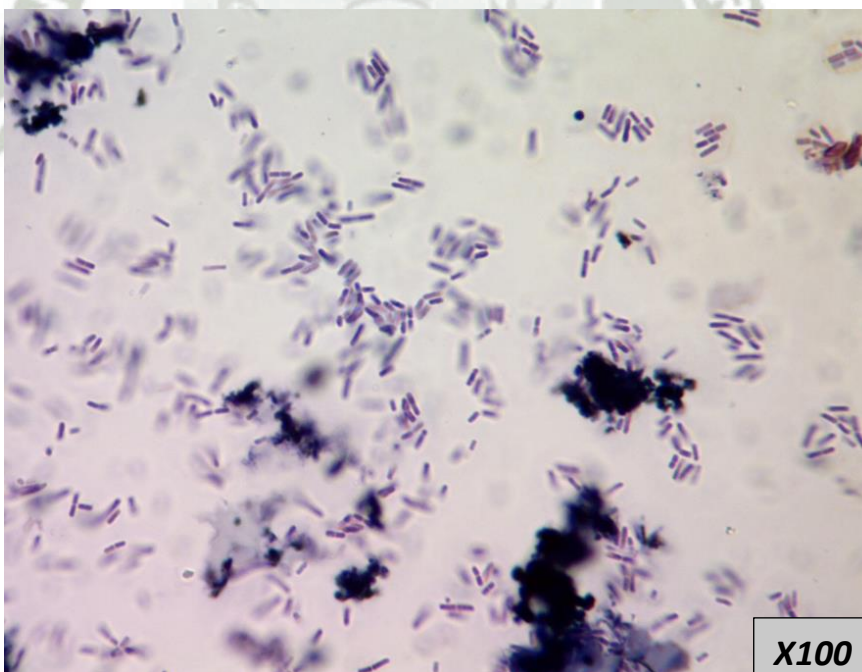


Figura 13. En el cultivo de la muestra L3 se observaron bacilos pequeños, Gram positivo de una de las cepas aisladas del lacto suero residual.

4.1.4. CARACTERIZAR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS MEDIANTE PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

4.1.4.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

4.1.4.1.1. FERMENTACIÓN DE GLUCOSA PARA LA PRODUCCIÓN DE GAS.

Las bacterias inoculadas en los medios T.S.I. presentaron reacción a las 48 horas, dando como resultado que el cultivo de la muestra L1, no presentó ruptura en el medio de cultivo, a comparación de los cultivos de las muestras L2 y L3 que, si, presentaron ruptura en el medio de cultivo en la parte inferior del tubo de ensayo, lo que significa que el cultivo L1 no es productora de gas mientras que los cultivos L2 y L3 si son productoras de gas porque hubo consumo del carbohidrato (glucosa) en el medio. Los resultados se siguieron según descritos por Lehman D. en el protocolo Triple Sugar Iron Agar Protocols (138).

4.1.4.1.2. PRUEBA PARA SABER EL TIPO DE ISÓMERO DEL ÁCIDO LÁCTICO PRODUCIDO.

Las bacterias lácticas de los cultivos de la muestra L2 y L3 fueron caracterizadas por la producción de diferentes isómeros del ácido láctico mediante la fermentación de la glucosa, debido a que presentaron una producción de gas positiva.

Las cepas reaccionaron al azul de tetrazolio mostrando diferenciación en los resultados, mientras que la cepa de la muestra L2 dio como resultado ninguna coloración dando a entender que esta cepa es exclusivamente productora de ácido láctico con isómero L (+). La cepa de la muestra L3 dio como resultado una coloración un halo azulado tenue dando a entender que esta cepa es productora de dos tipos de ácido láctico con isómero (D/L), esto ayudó a identificar el género de la cepa como *Lactobacillus Heterofermentativo*. Esta prueba se realizó siguiendo la metodología de Botero SPB en su investigación Detection of lactic acid isomers: Metabolites of lactic acid bacteria isolated from Colombian sourdough. Lo cual es

comparado según los reportes descritos por G, Boone et en su libro *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology* (134), (9).

4.1.4.2. PRUEBAS FISICAS

4.1.4.2.1. CRECIMIENTO A TEMPERATURAS DE 10 °C Y 45 °C.

Se escogió para esta prueba la cepa proveniente del cultivo de la muestra L1, debido a que no se identificó la formación de tétradas en la identificación microscópica para ello se cultivó en un medio M.R.S a temperaturas de 10 °C para poder identificar si pertenece al género *Streptococcus* por su inhibición a temperaturas de 10 °C y si muestra señales de crecimiento, al realizar la prueba de temperaturas altas, véase en la Figura 4.

La cepa mostró un crecimiento positivo a temperaturas cercanas a 10 °C a 8 horas de su inoculación en el medio de cultivo, lo que llevó a realizar la siguiente prueba a altas temperaturas para poder identificar si pertenece a los géneros *Vagococcus/Lactococcus* por su inhibición a temperaturas de 45 °C o si pertenece al género *enterococcus* por su crecimiento a esta temperatura, véase en la Figura 4.

La cepa mostró un crecimiento positivo a temperaturas cercanas a 45 °C a 8 horas de su inoculación en el medio de cultivo, lo que daría como resultado a la identificación de la cepa L1 siendo del género *enterococcus*, lo cual es comparado según los reportes descritos por G, Boone et en su libro *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology* (9).

4.1.4.2.2. TOLERANCIA A pH 4.5.

Se escogió para esta prueba la cepa proveniente del cultivo de la muestra L2, debido a que se identificó que la cepa no genera gas, su morfología presenta una forma de bastón y la prueba del isómero ácido láctico dio como resultado ácido láctico L (+) por lo que se realizó una prueba de tolerancia a pH sembrando la cepa en el medio M.R.S. ajustado con HCl 1 N a un pH de 4.5 para ver si el microorganismo crecía en ambientes de pH bajos véase en la Figura 4.

La cepa mostró un crecimiento negativo a las 24 horas de su inoculación en el medio de cultivo, y esto es debido a que la bacteria no pudo desarrollarse en un medio donde el pH sea ácido, lo cual daría como resultado a la identificación de la cepa L2 siendo del género *carnobacterium*. y comparado según los reportes descritos por G, Boone et en su libro *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology* (9).

Tabla 4. Resultados de la Identificación de las Bacterias Aisladas del Suero Láctico Residual.

	<i>Cepas provenientes de Lactosuero</i>		
	<i>L1</i>	<i>L2</i>	<i>L3</i>
Crecimiento en MRS	Positivo	Positivo	Positivo
Producción de Gas a partir de Glucosa	Negativo	Positivo	Positivo
Tinción Gram	Positivo	Positivo	Positivo
(Cocos o Bastones)	Coco	Bastones	Bastones
Tamaño	Pequeños	Grandes Largos	Pequeños
Formación de tetradas	Negativo	-	-
(L) Isomero de Ácido Lactico (D/DL)	Isomero de Ac. Lactico (D)	Isomero de Ac. Lactico (L)	Isomero de Ac. Lactico (D/L)
Crecimiento a 10 C	Positivo	-	-
Crecimiento a 45 C	Positivo	-	-
Crecimiento en pH 4.5	-	Negativo	-
	<i>Enterococcus</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>Heterofermentiva Lactobacillus/Weissella</i>

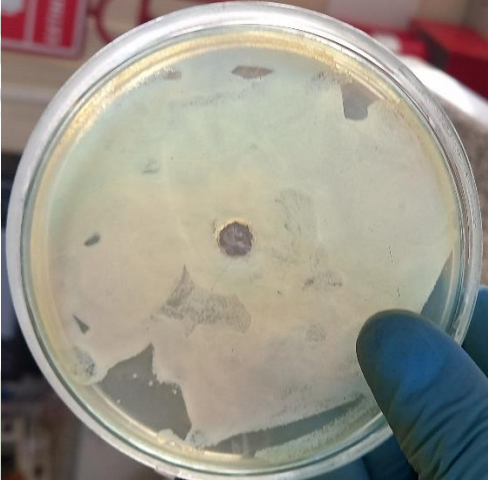
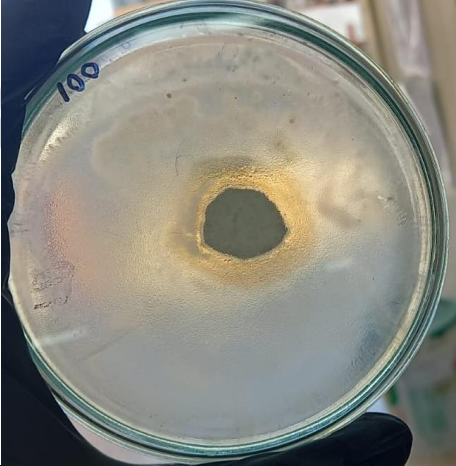
En la prueba de fermentación de glucosa para la producción de gas, las cepas que dieron positivo a la prueba fueron las de cepas L2 y L3 a comparación de la L1 donde dio resultado negativo. En las características microscópicas se realizó una tinción Gram en las cepas que se aislaron en Agar M.R.S, que nos demuestra que la tinción es Gram Positiva en las cepas aisladas del Lactosuero, en el microscopio se observó que la cepa L1 presentaba una morfología en forma de coco donde no formaba tétradas, mientras que la cepa L2 y L3 mostraron una morfología en forma de bastón. Viendo las características de la cepa L1 se optó usar una prueba de crecimiento a

temperaturas cercanas a 10 °C y a 45 °C donde la cepa pudo crecer a diferentes temperaturas, lo que daría como resultado que la cepa L1 pertenece al género *Enterococcus*. Las cepas L2 y L3 presentaron características similares por lo cual se tuvo que hacer una prueba sobre el tipo de isómero del ácido láctico producido, las cuales mostraron diferenciación, dicha prueba mostró que la cepa L3 producía ácido láctico con isómero D/L, lo que daría como resultado que la cepa L3 pertenece a los género *Lactobacillus Heterofermentiva /Weissella*, mientras que la cepa L2 producía ácido láctico con isómero L (+), esta cepa tuvo que ser sometida a una prueba de tolerancia de pH ácido donde se sembró en un medio con pH 4.5 dando como resultado un nulo crecimiento en el medio de cultivo lo que daría como resultado que la cepa L2 pertenece al género *Carnobacterium*. El diagrama de flujo de todas las pruebas que se hicieron se puede observar en la Figura 4. Todas estas características para la identificación de las bacterias aisladas se pudieron comprobar en los reportes descritos por G, Boone et en su libro *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology* (9).

4.2. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE SISB SUSTANCIAS INHIBIDORAS SIMILARES A BACTERIOCINAS EVALUANDO EL EFECTO INHIBITORIO DE LAS BACTERIAS ACIDO-LACTICAS NATIVAS DEL LACTOSUERO SOBRE *ESCHERICHIA COLI*.

La prueba de difusión en disco en agar para detectar cepas de Bacterias Acido-Lácticas productoras de SISB sustancias inhibidoras similares a bacteriocinas de las 3 cepas aisladas e identificadas del lactosuero residual dieron como respuesta un solo resultado positivo de las 3 cepas aisladas del lactosuero, las cuales se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultado de la identificación de bacterias productoras de SISB Sustancias Inhibidoras Similares a Bacteriocinas.

Cepas provenientes de Lactosuero	L1		Resultado Negativo del ensayo de difusión en disco en agar donde no se detectó la presencia de SISB sustancias inhibidoras similares a bacteriocinas.
	L2		Resultado Negativo del ensayo de difusión en disco en agar donde no se detectó la presencia de SISB sustancias inhibidoras similares a bacteriocinas.
	L3		Resultado Positivo del ensayo de difusión en disco en agar donde se detectó la presencia de SISB sustancias inhibidoras similares a bacteriocinas.

El método de difusión permitió una evaluación inicial del potencial antimicrobiano de las cepas estudiadas. Según la identificación taxonómica de las Bacterias Aisladas del Suero Láctico Residual de las tres bacterias aisladas, la bacteria L1 se identificó con el género *Enterococcus sp.*, la bacteria L2 se identificó con el género *Carnobacterium sp.* y la bacteria L3 se identificó con el género *Lactobacillus heterofermentativo*, esta última se caracterizó por una actividad antimicrobiana muy alta hacia el microorganismo indicador utilizado en el estudio que se ilustra en la Tabla 5. Según antecedentes de este género tiene una capacidad de inhibir patógenos como la *Escherichia Coli*. Muchos autores ya han demostrado la actividad antibacteriana de Bacterias Ácido-Lácticas según los reportes de T Kaewchomphunuch et al, 2022 en esta investigación utilizaron el mismo método para *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* que pudieron inhibir el crecimiento de patógeno de la *Escherichia Coli* aislada de cerdos en Tailandia. En la investigación de R Georgieva et al 2015 se observaron la capacidad antimicrobiana y susceptibilidad antibiótica de 13 tipos *Lactobacillus homofermentativas*, 10 tipos *Lactobacillus heterofermentativas* y tres tipos Bifidobacterias frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y *Candida albicans* dando como resultado que la *Lactobacillus Bulgaricus* tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de la *Escherichia Coli*, (135), (139).

En la Tabla 5 muestran una zona de inhibición del crecimiento del microorganismo indicador observado (*Escherichia Coli*) para las cepas L1 (*Enterococcus*), L2 (*Carnobacterium*) y L3 (*Lactobacillus Heterofermentativo*) examinadas en el estudio y la cepa indicadora utilizadas (*Escherichia Coli*). La actividad antimicrobiana de la cepa L3 (*Lactobacillus Heterofermentativo*) examinada fue diversa, lo que confirma que las propiedades antimicrobianas son específicas de la cepa como lo indican varios investigadores. Los sobrenadantes de la cepa de L3 (*Lactobacillus Heterofermentativo*) de lactosuero residual mostraron actividad

antimicrobiana, lo que sugiere la capacidad de estas cepas para sintetizar bacteriocinas. Esta propiedad no se observó en las cepas de L1 (*Enterococcus*) y las cepas de L2 (*Carnobacterium*) o en otros casos la actividad antimicrobiana que se media por los halos de inhibición de estas cepas fue demasiado baja, el diámetro de medición de los halos era minúscula casi nula en comparación con la cepa L3 (*Lactobacillus Heterofermentativo*) esta actividad antimicrobiana de la cepa L3 es debido a la producción de bacteriocinas que expresan una actividad antimicrobiana frente a la *e.coli*, esto se atribuye a que la cepa L3 ha generado mecanismos de defensa frente a la *e.coli* la cual puede haber estado en el medio que se aisló (lactosuero residual), este medio es un ambiente propicio para el desarrollo de los *Lactobacillus* a comparación de otras bacterias Ácido-Lácticas encontradas como *Enterococcus* y *Carnobacterium* esto es comparable a la investigación de A. Oldak et al, 2017 en la que se trabajó con cepas de *Lactobacillus Plantarum* provenientes de dos tipos de quesos polcas tradicionales Oscypek y korycinski, con el objetivo principal de evaluar propiedades antimicrobianas de estas utilizando cepas indicadoras que eran la *Listeria Monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecium*. Los resultados finales de esta investigación mostraron que la cepa de *Lactobacillus plantarum*, proveniente de quesos Korycinski, desarrollaron mayor actividad antagónica contra la *E. coli* en comparación con *Lb. Plantarum* proveniente de quesos Oscypek, otros resultados similares se mostraron en la investigación de R. Kashyap en la cual se trabajó con cepas de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus Casei* aisladas de Calostro Bovino evaluando su capacidad antimicrobiana frente varias especie de *E.coli* obteniendo resultados significativos en la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* frente estas especies de *e.coli*. Todo estos datos sugieren que los *Lactobacillus* puede haber sido inducidas por la presencia de estos microorganismos en el ambiente, y por lo tanto desarrollaron un mecanismo de defensa contra *Escherichia Coli* (140) (141).

4.3. DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LAS SUSTANCIAS INHIBITORIAS SIMILARES A LAS BACTERIOCINA PROVENIENTES DE LAS BACTERIAS ACIDOLACTICAS NATIVAS SOBRE *ESCHERICHIA COLI*.

Se realizaron 3 repeticiones de cada dilución del ensayo de difusión en disco en agar para detectar la concentración mínima inhibitoria de las cepas de Bacterias Acido-Lácticas productoras de SISB dando como resultado una zona libre por inhibición midiéndose los diámetros, se sacó el radio y el promedio de las 3 repeticiones. Con este promedio se calculó el Área de zona libre, con este dato se pudo calcular el resultado en AU (expresada en mm^2/mL), que es la unidad de área de la zona de inhibición por unidad de volumen como se muestra en la Tabla 6

Tabla 6. Cuadro de resultados del ensayo de difusión en disco en agar.

	Dilución	Diámetro Zona libre, mm	Radio Zona libre, mm	Promedio Radio Zona libre, mm	Área de zona libre L_z , mm^2	Actividad (SISB), $\text{mm}^2 \text{mL}^{-1}$
Placas	10^0 A	33	16.5	17.3	934.346	9756.08
	10^0 B	34	17			
	10^0 C	36.5	18.25			
	10^{-1} A	46	23	22.2	1542.874	17362.67
	10^{-1} B	43	21.5			
	10^{-1} C	44	22			
	10^{-2} A	52	26	27.5	2374.625	27759.56
	10^{-2} B	58	29			
	10^{-2} C	55	27.5			
	10^{-3} A	62	31	28.3	2520.722	<u>29585.78</u>
	10^{-3} B	54	27			
	10^{-3} C	54	27			
	10^{-4} A	41.5	20.75	22.8	1625.146	18391.08
	10^{-4} B	50	25			
	10^{-4} C	45	22.5			

Se hizo concentración mínima inhibitoria de las sustancias inhibitorias similares a bacteriocinas en diferentes diluciones dando como mejor resultado la dilución 10⁻³. Kaewchomphunuch T. realizó la misma prueba con cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* frente a la *E.coli* arrojando datos similares a los vistos en este ensayo incluso los datos obtenidos resultaron mayores a los presentado por Kaewchomphunuch T. En la investigación de R. Kashyap en la cual se trabajó con cepas de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus Casei* aisladas de Calostro Bovino evaluando su capacidad antimicrobiana frente varias especies de *E.coli* concluyendo que las cepas más sensibles requirieron menos concentración de Sustancias Inhibitoria parecidas a Bacteriocitas para la inhibición Por otra parte, la mayoría de las cepas patógenas requieren niveles más altos. Nuestra cepa de *Lactobacillus* aislada del lactosuero residual requirió una dilución relativamente alta para poder determinar su concentración mínima inhibitoria, esto deduciría que la cepa de *e.coli* que se aisló de la muestra de estiércol bovino era una cepa patógena (135), (141).

En nuestro estudio se revelaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad antimicrobiana de la cepa de *Lactobacillus Homofermentativo* frente a bacterias de coliforme fecal en este caso especies como la *Escherichia Coli*. El valor F del ANOVA nos indica que, si existe una diferencia significativa entre los niveles de la variable independiente que en este caso es la bacteria acido láctica aislada del lactosuero residual. A partir de los análisis de ANOVA encontramos que los valores (Valor F = 22.3515385, Valor P = 5.66318E-05 < 0.05), por lo que cuando la probabilidad es 5.66318E-05 es menor a 0,05 y el valor F que es 22.3515385 es mayor al valor P esto indicaría que las variables de tratamiento tienen diferencias significativas.

Tabla 7. Tabla resumen del Análisis de Varianza

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	242.1416667	4	60.5354167	22.3515385	5.66318E-05
Dentro de los grupos	27.08333333	10	2.70833333		
Total	269.225	14			

Se realizó el método de Tuckey con los datos obtenidos del estudio, esto permite comparar pares de medias a fin de determinar si existen diferencia o no significativamente entre esos pares

ICs simultáneos de 95 % de Tuckey

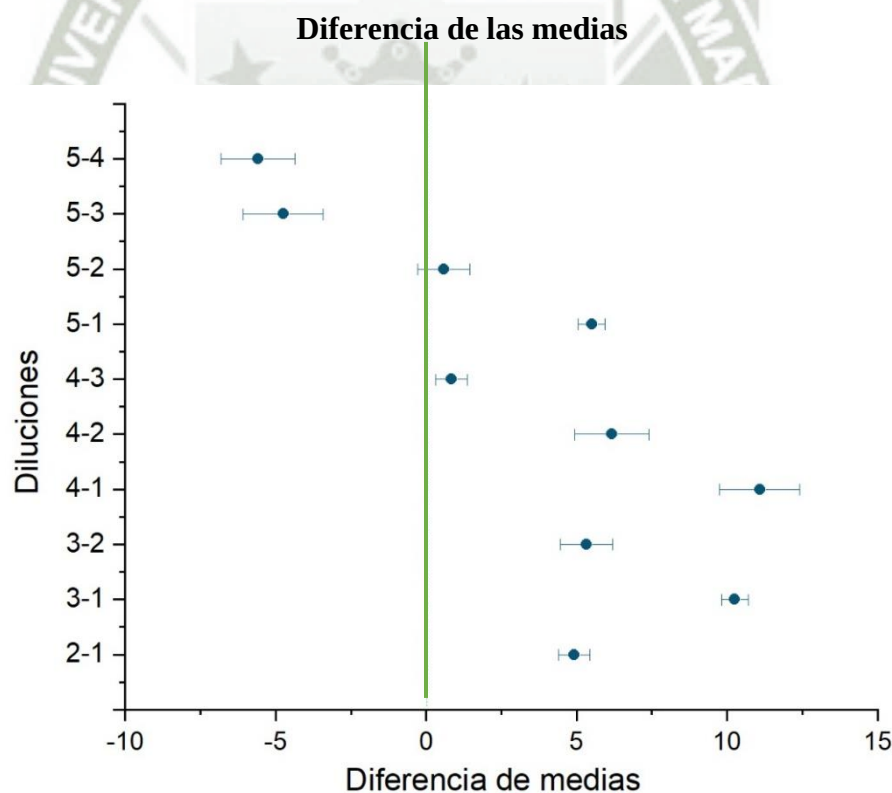


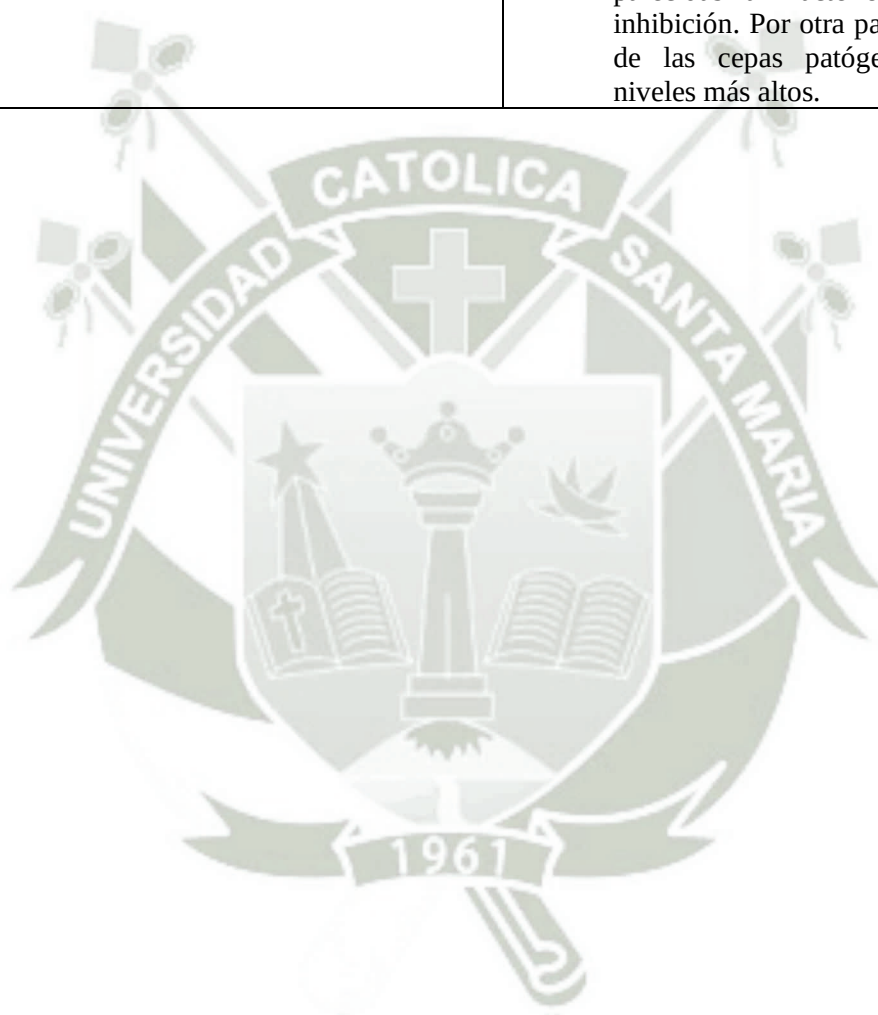
Figura 14. Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes

Las medias de los datos obtenidos de las diluciones de 2-1, 3-1, 3-2 4-1, 4-2, 5-3 y 5-4 son significativamente diferentes y en la gráfica de “Diferencia de Medias” estos datos no contienen cero a diferencia de las medias de 5-2 y 4-3 que contienen intervalos a cero o cercano a cero estos últimos datos no son significativos sus medias son iguales.

Tabla 8. Cuadro Comparando de los Resultados Obtenidos con otras Investigaciones relacionadas.

Cuadro Comparativo de Resultados	
Se determinó la identidad taxonómica de las bacterias Ácido-Lácticas provenientes del lactosuero encontrando todas sus características fisiológicas y bioquímicas.	G, Boone identificó todas estas mismas características en su libro <i>BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology</i>
- Se Identificó a las Bacterias productoras de Sustancias Inhibitorias Similares a las Bacteriocinas entre las 3 cepas aisladas la cual resulto ser <i>Lactobacillus Heterofermentativo</i> la que produce este tipo de Sustancias. - Este dato sugiere que el <i>Lactobacillus</i> puede haber sido inducido por la presencia de estos microorganismos en el ambiente y por lo tanto desarrollaron un mecanismo de defensa contra <i>Escherichia Coli</i>.	A. Oldak et al, 2017 trabajó con Bacterias Ácido Lácticas aisladas de Quesos nativos, comparando la capacidad antimicrobiana de las cepas aisladas frente a bacterias indicadoras de contaminación alimentaria entre ellas estaba la <i>E.coli</i>, R. Kashyap investigo con cepas de <i>Lactobacillus</i> aisladas de Calostro Bovino evaluando su capacidad antimicrobiana frente varias especies de <i>E.coli</i> obteniendo resultados significativos. - Tanto la investigación de A. Oldak como la de R. Kashyap concluyen la existencia de este tipo de sustancias en Bacterias Ácido-Lácticas que tienen propiedades antimicrobianas frente a bacterias patógenas para el ser humano.
Se hizo concentración mínima inhibitoria de las sustancias inhibitorias similares a bacteriocinas en diferentes diluciones dando como mejor resultado la dilución 1/1000.	Kaewchomphunuch T. realizó la misma prueba con Bacterias Ácido Lácticas del mismo género frente a la <i>E.coli</i> arrojando datos similares a los vistos en este ensayo incluso los datos obtenidos resultaron mayores a los

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• El <i>Lactobacillus</i> aislado del lactosuero residual requirió una dilución relativamente alta para poder determinar su concentración mínima inhibitoria, esto deduciría que la cepa de <i>E.coli</i> que se aisló de la muestra de estiércol bovino era una cepa patógena. | <p>presentados por Kaewchomphunuch T.</p> <ul style="list-style-type: none">• En la investigación de R. Kashyap en la cual se trabajó con cepas de <i>Lactobacillus</i> aisladas de Calostro Bovino evaluando su capacidad antimicrobiana frente varias especies de <i>E.coli</i> concluyeron que las cepas más sensibles requirieron menos concentración Sustancias Inhibitoria parecidas a Bacteriocinas para la inhibición. Por otra parte, la mayoría de las cepas patógenas requieren niveles más altos. |
|---|---|

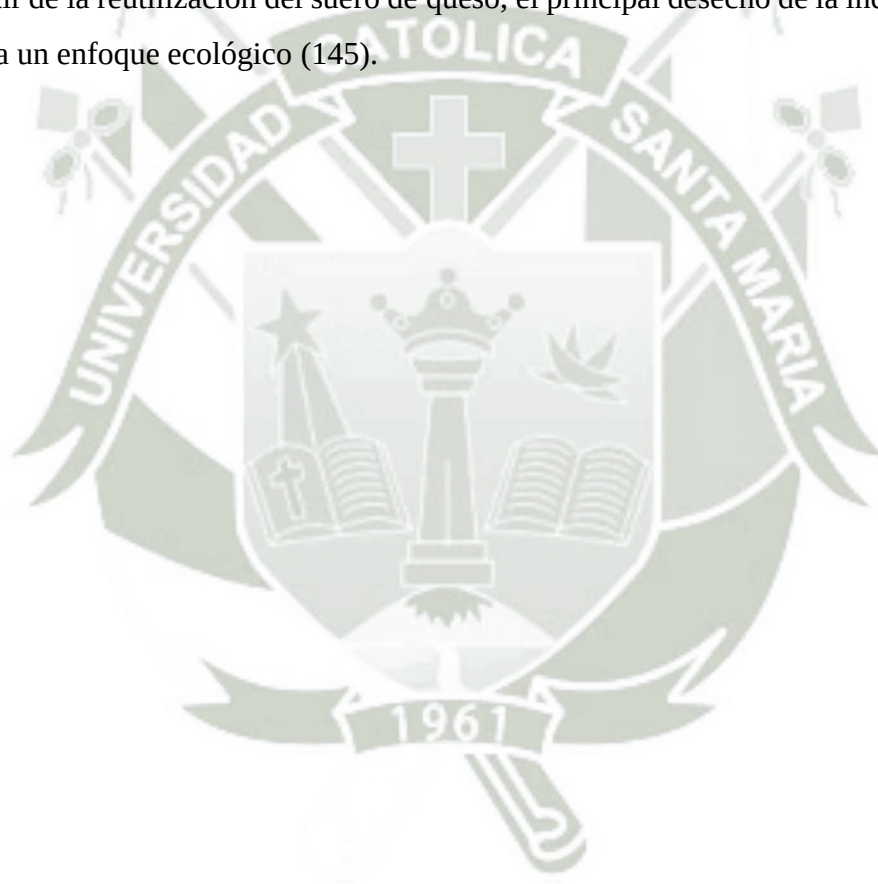


CONCLUSIONES

PRIMERA: Se Aisló bacterias ácido lácticas provenientes del lactosuero y luego se escogieron 3 cepas, la cuales se caracterizó mediante pruebas macroscópicas y microscópicas para encontrar el género de las cepas aisladas y se prosiguió a una caracterización más específica de las bacterias ácido lácticas mediante pruebas bioquímicas y pruebas físicas dando como resultado tres tipos de especies identificadas (*Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus Heterofermentativo*). Además, las investigaciones bibliográficas de estos tipos de microorganismos señalan que estas especies se utilizan para la producción de diferentes tipos de quesos y productos lácteos, en el caso de los *Enterococcus* constituyen parte del microbiota autóctono de quesos artesanales y contribuyen con el desarrollo del aroma y maduración de los quesos. Existen antecedentes de la existencia de *Carnobacterium* tanto en quesos como en leche pausterizada la cual confirmaría la existencia de formar parte de su microbiota. Por último, se tiene antecedentes desde hace varias décadas que los Lactobacilos son comúnmente presentes en la flora bacteriana de los quesos hasta se los utiliza como cultivo iniciador para su elaboración. Todas estas cepas, sintetizan péptidos antimicrobianos que pueden suprimir el crecimiento de microorganismos patógenos contaminantes de alimentos lo que se deduce su existencia en el lacto suero residual que se analizó (142) (143) (144).

SEGUNDA: Los sobrenadantes de la cepa de *Lactobacillus Heterofermentativo* de lactosuero residual mostraron actividad antimicrobiana, lo que sugiere la capacidad de estas cepas para sintetizar bacteriocinas. Esta propiedad no se observó en las cepas de *Enterococcus* y las cepas de *Carnobacterium*, o en otros casos la actividad antimicrobiana que se calculó por los halos de inhibición de estas cepas fue demasiado baja, el diámetro de medición de los halos era casi nula en comparación con la cepa *Lactobacillus Heterofermentativo*. La actividad antimicrobiana de esta cepa es debido a la producción de bacteriocinas que expresan una actividad antimicrobiana lo que sugiere que puede haber sido inducidas por la presencia de estos microorganismos en el ambiente (lacto suero residual) y por lo tanto desarrollaron un mecanismo de defensa contra *E. coli*

TERCERA: Se evaluó la concentración mínima inhibitoria de una bacteria ácido láctica procedentes del lactosuero residual frente a coliformes fecales como es la *Escherichia Coli*, durante un periodo de 8 hrs, teniendo como resultado la dilución máxima de la Sustancia Inhibitoria similar a la Bacteriocina de la Cepa L3 (*Lactobacillus Heterofermentativo*) para reducir significativamente el crecimiento de la *Escherichia Coli*,. En el análisis de varianza se concluye que, si, existe una diferencia significativa entre tratamientos, resaltando la concentración de “1/1000” como el mejor resultado. Además, el hecho de que la Sustancia Inhibitoria similar a la Bacteriocina se haya obtenido a partir de la reutilización del suero de queso, el principal desecho de la industria quesera, indica un enfoque ecológico (145).



RECOMENDACIONES

PRIMERA: Se sugiere mandar a secuenciar la especie de *Lactobacillus* que se aisló del lactosuero residual para realizar una identificación molecular y poder investigar más de sus propiedades de este tipo de microorganismo.

SEGUNDA: Para un mejor entendimiento en temas antimicrobianos se sugiere aplicar este tipo de Sustancias Antimicrobianas provenientes de Bacterias Ácido-Lácticas como bio-conservante en algún alimento sin tratamiento higiénico para su posterior análisis frente a microorganismos patógenos durante el procesado y manipulación, esto ayudaría a observar su aplicación como un bio-conservante alimentario.

TERCERA: Es necesario probar su actividad antimicrobiana de esta Bacteria Ácido-Láctica contra diferentes patógenos transmitidos por los alimentos en el futuro. Se recomienda realizar este tipo de análisis para poder observar su aplicación antimicrobiana en diferentes especies patógenas y poder recopilar datos para futuras aplicaciones.

CUARTA: Otra aplicación que se podría aplicar es en la mejora de respuesta inmune en algún ganado o animal que sea susceptible a enfermarse de coliformes fecales mediante la administración en este tipo de microorganismos en su dieta como cepa probiótica

QUINTA: Aislar, analizar identificar y secuenciar otros tipos de microorganismos como bacterias ácido-lácticas que se encuentran en el lactosuero residual, para poder realizar o producir un consorcio microbiano que ayude en este tipo de procesos biotecnológicos.

REFERENCIAS

1. Ministerio de Salud del Perú. Plan Multisectorial para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos 2019-2021. Plan Multisectorial Del Perú [Internet]. 2019;1–96. Available from: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Acceso/URM/GestionURMT rabSalud/ReunionTecnica/VIII/Dia2/Antimicrobianos/PlanNacionalATM-2017-2021.pdf>
2. MINAGRI. Diagnóstico de Crianzas Priorizadas para el Plan Ganadero 2017-2021. Libro [Internet]. 2017;69. Available from: <http://repositorio.minagri.gob.pe/jspui/bitstream/MINAGRI/328/1/plan-ganadero-2017-2021.pdf>
3. Henry Quiñones Ramirez, Wilder Trejo Cadillo J juscamaita M. Evaluacion de la Calidad de un Abono Liquido Producido Vía Fermentación Homoláctica de Heces de Alpaca. Ecol Apl. 2016;15(2).
4. Peralta-Veran L, Juscamaita-Morales J, Meza-Contreras V. Obtención Y Caracterización De Abono Orgánico Líquido a Través Del Tratamiento De Excretas Del Ganado Vacuno De Un Establo Lechero Usando Un Consorcio Microbiano Ácido Láctico. Ecol Apl. 2016;15(1):1.
5. CDC. Innovating to Slow the Spread: CDC Combats Antimicrobial Resistance. 2022;
6. Nelson RE, Hatfield KM, Wolford H, Samore MH, Scott RD, Reddy SC, et al. National estimates of healthcare costs associated with multidrug-resistant bacterial infections among hospitalized patients in the United States. Clin Infect Dis. 2021;72(Suppl 1):S17–26.
7. Porter JR. Antony Van Leeuwenhoek. Tercentenary of his discovery of bacteria. Bacteriol Rev. 1976;40(2):260–9.
8. Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int J Food Microbiol. 1997;36(1):1–29.
9. BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY GM (EDS.). Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology . Springe, editor. Vol. Three. New York, 2001.; 2001. 2001 p.
10. Stropfová V, Laukova A. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria from canine faeces. Bull Vet Inst Pulawy. 2004;48(3):215–8.
11. Uribe, Margarita María Londoño; José Uriel Sepúlveda Valencia; Suescún, Aldo Hernández Monzón JEP. Bebida Fermentada de suero de queso fresco inoculada con Lactobacillus casei. Rev Fac Nac Agron. 2008;61(1):4409–21.
12. James A. Poupard, Intisar Husain RFN. Biology of the bifidobacteria. Am Soc Microbiol [Internet]. 1983;37(2):8–34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413809/pdf/bactrev00041-0040.pdf>
13. Aznar R, Zúñiga M. ¿Que son las bacterias Lácticas ? Ist Agroquímica y Tecnol Aliment (IATA-CSIC). 2000;1–8.
14. Collins MD, Samelis J, Metaxopoulos J, Wallbanks S. Taxonomic studies on some

- leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J Appl Bacteriol.* 1993;75(6):595–603.
15. Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1983;49(3):209–24.
 16. Axelsson L. *Applied Microbial Systematics.* 4th ed. Vol. 81, Food Science & Technology. 2012. 10-11 p.
 17. Cabeza EA. Bacterias ácido-lácticas (BAL): Aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. *ResearchGate.* 2006;14(4):549–66.
 18. O. Kandler and N. Weiss. Regular, Non-Sporing Gram-Positive Rods. In: Sneath, H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. 1986;
 19. Weiss N, Schillinger U, Kandler O. *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmannii* and *Lactobacillus bulgaricus*, Subjective Synonyms of *Lactobacillus delbrueckii*, and Description of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* comb. nov. and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* comb. nov. *Syst Appl Microbiol.* 1983;4(4):552–7.
 20. Hofvendahl KBH-H. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzym Microb Technol* 26. 2000;26:87–107.
 21. Garcia CA, Arrázola GS, Durango AM. Biotechnological Production of Lactic Acid. *Temas Agrar.* 2010;15(2):9–26.
 22. Okafor N. Modern Industrial Microbiology and Biotechnology [Internet]. Vol. 3, Industrial. 2007. 954-955 p. Available from: http://www.socgenmicrobiol.org.uk/pubs/micro_today/book_reviews/MTNOV07/MTN07_12.cfm
 23. Ramirez J carmen ramirez, Ulloa PR, Velazquez MY, Ulloa JA, Romero FA. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Año 2.* 2011;32(3):561–76.
 24. Vásquez, S.; Suárez, H. y Zapata S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev Chil Nutr [Internet].* 2009;36(1):64–71. Available from: <http://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v36n1/art07.pdf>
 25. Stiles ME. Biopreservation by lactic acid bacteria . *PubMed Commons.* 2014;8879414.
 26. Dodd HM, Gasson MJ. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Genet Biotechnol Lact Acid Bact.* 2011;70(11171):211–51.
 27. Hilmi HA. Lactic Acid Bacteria and Their Antimicrobial Peptides : Induction , Detection , Partial Characterization , HANAN T . ABBAS HILMI Division of Microbiology Department of Food and Environmental Sciences. Environmental Sciences. 2010.
 28. R. KT. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. *FEMS Microbiol Rev [Internet].* 1993;12(1-3):39–85. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x>
 29. Nes IF, Diep DB, Håvarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.*

- 1996;70(2–4):113–28.
30. Pag U, Sahl H. Multiple Activities in Lantibiotics – Models for the Design of Novel Antibiotics ? 2002;815–33.
31. Diep DB, Nes IF. Ribosomally Synthesized Antibacterial Peptides in Gram Positive Bacteria. 2002;(1389):107–22.
32. Heredia P, Hernández A, González A, Vallejo B. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*. 2017;42(6):340–6.
33. Antibacterial Peptides Bacteriocins An overview of their Diverse Characteristics and Applications.pdf.
34. Yusuf MA, Mahkota BI, Istana J, Haziyaamin T, Tengku A, Hamid A. Lactic Acid Bacteria : Bacteriocin Producer : A Mini Review. 2013;3(4):44–50.
35. Bemena LD, Mohamed LA, Fernandes AM, Lee BH. Applications of bacteriocins in food , livestock health and medicine. 2014;3(12):924–49.
36. Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. 2014;13(Suppl 1):1–13.
37. Liao SF, Nyachoti M. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Anim Nutr* [Internet]. 2017;3(4):331–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.007>
38. Sobrino-López A, Martín-Belloso O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *Int Dairy J*. 2008;18(4):329–43.
39. Pinto MS, de Carvalho AF, Pires ACDS, Campos Souza AA, Fonseca da Silva PH, Sobral D, et al. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. *Int Dairy J* [Internet]. 2011;21(2):90–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.08.001>
40. Favaro L, Barretto Penna AL, Todorov SD. Bacteriocinogenic LAB from cheeses - Application in biopreservation? *Trends Food Sci Technol*. 2015;41(1):37–48.
41. Iseppi R, Pilati F, Marini M, Toselli M, de Niederhäusern S, Guerrieri E, et al. Anti-listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *Int J Food Microbiol*. 2008;123(3):281–7.
42. Chollet E, Sebti I, Martial-Gros A, Degraeve P. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control*. 2008;19(10):982–9.
43. Benech RO, Kheadr EE, Laridi R, Lacroix C, Fliss I. Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(8):3683–90.
44. Malheiros P da S, Sant’Anna V, Barbosa M de S, Brandelli A, Franco BDG de M. Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *Int J Food Microbiol*. 2012;156(3):272–

- 7.
45. Samelis J, Kakouri A, Rogga KJ, Savvaidis IN, Kontominas MG. Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4°C in vacuum packages. *Food Microbiol.* 2003;20(6):661–9.
46. Gallo LI, Pilosof AMR, Jagus RJ. Effect of the sequence of nisin and pulsed electric fields treatments and mechanisms involved in the inactivation of *Listeria innocua* in whey. *J Food Eng.* 2007;79(1):188–93.
47. Gallo LI, Pilosof AMR, Jagus RJ. Effective control of *Listeria innocua* by combination of nisin, pH and low temperature in liquid cheese whey. *Food Control.* 2007;18(9):1086–92.
48. von Staszewski M, Jagus RJ. Natural antimicrobials: Effect of Microgard™ and nisin against *Listeria innocua* in liquid cheese whey. *Int Dairy J.* 2008;18(3):255–9.
49. Kuipers A, Rink R, Moll GN. Prokaryotic Antimicrobial Peptides. *Prokaryotic Antimicrob Pept.* 2011;147–69.
50. Drider D, Belguesmia Y, Choiset Y, Prévost H, Dalgalarondo M, Chobert JM. Partial purification and characterization of the mode of action of enterocin S37: A bacteriocin produced by *enterococcus faecalis* S37 isolated from poultry feces. *J Environ Public Health.* 2010;2010.
51. Drider D, Bendali F, Naghmouchi K, Chikindas ML. Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2016;8(4):177–82.
52. Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2018;49:23–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>
53. Stern NJ, Eruslanov B V., Pokhilenko VD, Kovalev YN, Volodina LL, Perelygin V V., et al. Bacteriocins reduce *Campylobacter jejuni* colonization while bacteria producing bacteriocins are ineffective. *Microb Ecol Health Dis.* 2008;20(2):74–9.
54. Rihakova J, Cappellet JM, Hue I, Demnerova K, Fédérighi M, Prévost H, et al. In vivo activities of recombinant divercin V41 and its structural variants against *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):563–4.
55. Al Atya AK, Belguesmia Y, Chataigne G, Ravallec R, Vachée A, Szunerits S, et al. Anti-MRSA activities of enterocins DD28 and DD93 and evidences on their role in the inhibition of biofilm formation. *Front Microbiol.* 2016;7(MAY):1–12.
56. Jiang H, Li P, Gu Q. Heterologous expression and purification of plantaricin NC8, a two-peptide bacteriocin against *Salmonella* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ316. *Protein Expr Purif* [Internet]. 2016;127:28–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2016.06.013>
57. Caly DL, Chevalier M, Flahaut C, Cudennec B, Al Atya AK, Chataigné G, et al. The safe enterocin DD14 is a leaderless two-peptide bacteriocin with anti-*Clostridium perfringens* activity. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2017;49(3):282–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.016>

58. Seddik HA, Bendali F, Gancel F, Fliss I, Spano G, Drider D. Lactobacillus plantarum and Its Probiotic and Food Potentialities. Probiotics Antimicrob Proteins. 2017;9(2):111–22.
59. Cavera VL, Arthur TD, Kashtanov D, Chikindas ML. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2015;46(5):494–501. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.07.011>
60. Woraprayote W, Malila Y, Sorapukdee S, Swetwathana A, Benjakul S, Visessanguan W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. Meat Sci [Internet]. 2016;120:118–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.004>
61. Ben Lagha A, Haas B, Gottschalk M, Grenier D. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. Vet Res. 2017;48(1):1–12.
62. Pérez-Cano FJ, Dong H, Yaqoob P. In vitro immunomodulatory activity of Lactobacillus fermentum CECT5716 and Lactobacillus salivarius CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. Immunobiology. 2010;215(12):996–1004.
63. Dávila J, Reyes G, Corzo O. Diseño de un Plan HACCP para el Proceso de Elaboración de Queso Tipo Gouda en una Empresa de Productos Lácteos TT - Design of a HACCP Plan for the Gouda-type cheese-making process in a milk processing plant. Arch Latinoam Nutr [Internet]. 2006;56(1):60–8. Available from: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222006000100009&lang=es
64. Hernández M, Vélez JF. Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. Temas Sel Ing Aliment. 2014;13–22.
65. Snezana Jovanovic, Miroljub Barac OM. Whey proteins-Properties and Possibility of Application. Mljekarstvo. 2005;55(3):215–33.
66. Abd El-Salam MH, El-Shibiny S, Salem A. Factors affecting the functional properties of whey protein products: A review. Food Rev Int. 2009;25(3):251–70.
67. Santiago-Rodriguez TM, Tremblay RL, Toledo-Hernandez C, Gonzalez-Nieves JE, Ryu H, Santo Domingo JW, et al. Microbial quality of tropical inland waters and effects of rainfall events. Appl Environ Microbiol. 2012;78(15):5160–9.
68. Gómez YD, Elena M, Regalado M. Indicadores microbiológicos de calidad del agua en la costa oeste de Ciudad de la Habana. 2008;391:387–91.
69. Us-Epa. Global Anthropogenic Non-CO2 Greenhouse Gas Emissions:1990-2020. Environ Prot. 2006;1–274.
70. ATTRA Agricultura sustentable. Estiércol en Sistemas de Producción Orgánica. 2008;1–4.
71. López DJM, Berrueta DTU. Generalidades de bacterias. Recur en Bacteriol. 2011;11.
72. LeJeune JT, Wetzel AN. Preharvest control of Escherichia coli O157 in cattle. J Anim Sci. 2007;85(13 Suppl).
73. Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and

- disorders of the male reproductive tract? *Lancet*. 1993;341(8857):1392–5.
74. Bartoloni A, Pallecchi L, Benedetti M, Fernandez C, Vallejos Y, Guzman E, et al. Multidrug-resistant commensal *Escherichia coli* in children, Peru and Bolivia. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(6):907–13.
 75. Alzamora MC, Echevarría AC, Ferraro VM, Riveros MD, Zambruni M, Ochoa TJ. Resistencia antimicrobiana de cepas comensales de *Escherichia coli* en niños de dos comunidades rurales peruanas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2019;36(3):459.
 76. Boonmee M, Leksawasdi N, Bridge W, Rogers PL. Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: Experimental data and model development. *Biochem Eng J*. 2003;14(2):127–35.
 77. Kourkoutas Y, Xolias V, Kallis M, Bezirtzoglou E, Kanellaki M. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive , fermented milk and lactic acid production. 2005;40:411–6.
 78. *Escherichia coli* E, Chang D, Jung H, Rhee J. Homofermentative Production of D -o rL-Lactate in Metabolically Homofermentative Production of D - or L -Lactate in Metabolically Engineered *Escherichia coli* RR1. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(May).
 79. Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2010;141(SUPPL.):S15–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>
 80. Martínez Cruz P, Ibáñez AL, Monroy Hermosillo OA, Ramírez Saad HC. Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiol*. 2012;2012:1–13.
 81. Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R, Auclair E, Gancel F, Kempf I, et al. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Front Microbiol*. 2019;10(February):1–17.
 82. Tellez G, Pixley C, Wolfenden RE, Layton SL, Hargis BM. Probiotics/direct fed microbials for *Salmonella* control in poultry. *Food Res Int* [Internet]. 2012;45(2):628–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.047>
 83. Tsai YT, Cheng PC, Pan TM. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;96(4):853–62.
 84. Ashraf R, Shah NP. Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(7):938–56.
 85. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 2015;16(4):343–53.
 86. Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: Homeostasis and immunopathology. Vol. 5, *Nutrients*. 2013. 1869-1912 p.
 87. Kiczorowska B, Samolińska W, Marczuk J, Winiarska-Mieczan A, Klebaniuk R, Kowalczyk-Vasilev E, et al. Comparative effects of organic, traditional, and intensive production with probiotics on the fatty acid profile of cow's milk. *J Food Compos Anal*

- [Internet]. 2017;63:157–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.08.002>
88. Wells JM. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb Cell Fact.* 2011;10(SUPPL. 1):1–15.
 89. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008;72(4):728–64.
 90. Schlee M, Harder J, Köten B, Stange EF, Wehkamp J, Fellermann K. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte β -defensin 2. *Clin Exp Immunol.* 2008;151(3):528–35.
 91. Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, Diederichs B, Dmytrash A, Backer J, et al. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295(5):1025–34.
 92. Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Park Z, McCann MJ, Kelly WJ, et al. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol* [Internet]. 2010;10(1):316. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/316>
 93. Mathias A, Duc M, Favre L, Benyacoub J, Blum S, Corthésy B. Potentiation of polarized intestinal caco-2 cell responsiveness to probiotics complexed with secretory IgA. *J Biol Chem.* 2010;285(44):33906–13.
 94. Wang L, Li L, Lv Y, Chen Q, Feng J, Zhao X. *Lactobacillus plantarum* Restores Intestinal Permeability Disrupted by Salmonella Infection in Newly-hatched Chicks. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20752-z>
 95. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* (80-). 2011;331(6013):44–9.
 96. Liu H, Ji HF, Zhang DY, Wang SX, Wang J, Shan DC, et al. Effects of *Lactobacillus brevis* preparation on growth performance, fecal microflora and serum profile in weaned pigs. *Livest Sci.* 2015;178:251–4.
 97. Luongo D, Miyamoto J, Bergamo P, Nazzaro F, Baruzzi F, Sashihara T, et al. Differential modulation of innate immunity in vitro by probiotic strains of *Lactobacillus gasseri*. *BMC Microbiol.* 2013;13(1):1–12.
 98. Rizzo A, Fiorentino M, Buommino E, Donnarumma G, Losacco A, Bevilacqua N. *Lactobacillus crispatus* mediates anti-inflammatory cytokine interleukin-10 induction in response to *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2015;305(8):815–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.07.005>
 99. Li H, Zhang L, Chen L, Zhu Q, Wang W, Qiao J. *Lactobacillus acidophilus* alleviates the inflammatory response to enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 via inhibition of the NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in piglets. *BMC Microbiol* [Internet]. 2016;16(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0862-9>

100. Zhang CN, Zhang JL, Guan WC, Zhang XF, Guan SH, Zeng QH, et al. Effects of *Lactobacillus delbrueckii* on immune response, disease resistance against *Aeromonas hydrophila*, antioxidant capability and growth performance of *Cyprinus carpio* Huanghe var. Fish Shellfish Immunol [Internet]. 2017;68:84–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.012>
101. Beck BR, Kim D, Jeon J, Lee SM, Kim HK, Kim OJ, et al. The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Shellfish Immunol [Internet]. 2015;42(1):177–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.035>
102. Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: Implications for fundamental and biomedical research. Appl Environ Microbiol. 2008;74(16):4985–96.
103. Brisbin JT, Gong J, Orouji S, Esufali J, Mallick AI, Parvizi P, et al. Oral treatment of chickens with lactobacilli influences elicitation of immune responses. Clin Vaccine Immunol. 2011;18(9):1447–55.
104. Han J, Wang Y, Song D, Lu Z, Dong Z, Miao H, et al. Effects of *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus plantarum* on growth performance, immune function and volatile fatty acid level of caecal digesta in broilers. Food Agric Immunol [Internet]. 2018;29(1):797–807. Available from: <https://doi.org/10.1080/09540105.2018.1457013>
105. Naqid IA, Owen JP, Maddison BC, Gardner DS, Foster N, Tchórzewska MA, et al. Prebiotic and probiotic agents enhance antibody-based immune responses to *Salmonella Typhimurium* infection in pigs. Anim Feed Sci Technol [Internet]. 2015;201:57–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.12.005>
106. Zhu YH, Li XQ, Zhang W, Zhou D, Liu HY, Wang JF. Dose-dependent effects of *Lactobacillus rhamnosus* on serum interleukin-17 production and intestinal T-cell responses in pigs challenged with *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 2014;80(5):1787–98.
107. Asgari F, Madjd Z, Falak R, Bahar MA, Heydari Nasrabadi M, Raiani M, et al. Probiotic feeding affects T cell populations in blood and lymphoid organs in chickens. Benef Microbes. 2016;7(5):669–75.
108. Rocha TS, Baptista AAS, Donato TC, Milbradt EL, Okamoto AS, Rodrigues JCZ, et al. Evaluation of in vitro and in vivo adhesion and immunomodulatory effect of *Lactobacillus* species strains isolated from chickens. Poult Sci. 2012;91(2):362–9.
109. Kiczorowska B, Samolińska W, Al-Yasiry ARM, Kiczorowski P, Winiarska-Mieczan A. The natural feed additives as immunostimulants in monogastric animal nutrition - A review. Ann Anim Sci. 2017;17(3):605–25.
110. Wenk, C., Pfirter, H. P., and Bickel H. Energetic aspects of feed conversion in growing pigs. Livest Prod Sci. 1980;7:793–9.
111. Russo P, Capozzi V, Arena MP, Spadaccino G, Dueñas MT, López P, et al. Riboflavin-overproducing strains of *Lactobacillus fermentum* for riboflavin-enriched bread. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98(8):3691–700.

112. Sharifuzzaman SM, Austin B. Probiotics for disease control in aquaculture. *Diagnosis Control Dis Fish Shellfish*. 2017;189–222.
113. Chaucheyras-Durand F, Durand H. Probiotics in animal nutrition and health. *Benef Microbes*. 2010;1(1):3–9.
114. Forte C, Moscati L, Acuti G, Mugnai C, Franciosini MP, Costarelli S, et al. Effects of dietary *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus subtilis* on laying performance, egg quality, blood biochemistry and immune response of organic laying hens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2016;100(5):977–87.
115. Peng WX, Marchal JLM, van der Poel AFB. Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 2018;237(November 2017):129–53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.01.017>
116. Gratz S, Wu QK, El-Nezami H, Juvonen RO, Mykkänen H, Turner PC. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B1 transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(12):3958–64.
117. Ahlberg SH, Joutsjoki V, Korhonen HJ. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation [Internet]. Vol. 207, *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V.; 2015. 87–102 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.042>
118. Abbès S, Ben Salah-Abbès J, Jebali R, Younes R Ben, Oueslati R. Interaction of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in mice causes immunotoxicity and oxidative stress: Possible protective role using lactic acid bacteria. *J Immunotoxicol*. 2016;13(1):46–54.
119. Zoghi A, Khosravi-Darani K, Sohrabvandi S. Surface Binding of Toxins and Heavy Metals by Probiotics. *Mini-Reviews Med Chem*. 2014;14(1):84–98.
120. Li H, Duan C, Zhao Y, Gao L, Niu C, Xu J, et al. Reduction of aflatoxin B1 toxicity by *Lactobacillus plantarum* C88: A potential probiotic strain isolated from Chinese traditional fermented food “Tofu.” *PLoS One*. 2017;12(1):1–16.
121. Liew WPP, Nurul-Adilah Z, Than LTL, Mohd-Redzwan S. The binding efficiency and interaction of *Lactobacillus casei* Shirota toward aflatoxin B1. *Front Microbiol*. 2018;9(JUL):1–12.
122. El-Nezami H, Kankaanpää P, Salminen S, Ahokas J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food Chem Toxicol*. 1998;36(4):321–6.
123. Nybom SMK, Salminen SJ, Meriluoto JAO. Removal of microcystin-LR by strains of metabolically active probiotic bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;270(1):27–33.
124. Pizzolitto RP, Salvano MA, Dalcero AM. Analysis of fumonisin B 1 removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B 1 and the nature of the binding process. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2012;156(3):214–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.024>
125. Piotrowska M. The adsorption of ochratoxin a by *Lactobacillus* species. *Toxins (Basel)*. 2014;6(9):2826–39.

126. Ruas-Madiedo P, Medrano M, Salazar N, De Los Reyes-Gavilán CG, Pérez PF, Abraham AG. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate in vitro the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. *J Appl Microbiol.* 2010;109(6):2079–86.
127. Guo S, Liu D, Zhang B, Li Z, Li Y, Ding B, et al. Two *Lactobacillus* species inhibit the growth and α -toxin production of *Clostridium perfringens* and induced proinflammatory factors in chicken intestinal epithelial cells in vitro. *Front Microbiol.* 2017;8(OCT):1–12.
128. Kalschne DL, Womer R, Mattana A, Sarmiento CMP, Colla LM, Colla E. Characterization of the spoilage lactic acid bacteria in “sliced vacuum-packed cooked ham.” *Brazilian J Microbiol.* 2015;46(1):173–81.
129. Agrocalidad. Laboratorio Control de Calidad de Leche. Nstruictivoint/CI/010 [Internet]. 2020;7:1–18. Available from: <http://www.agrocalidad.gob.ec/coord-gral-laboratorios/laboratorios-de-diagnostico-de-inocuidad-de-los-alimentos-y-control-de-insumos-agropecuarios/laboratorio-control-de-calidad-de-leche/>
130. Martínez-lópez V, Trinidad S, Ruiz BS, Patricia L. Dinámica poblacional y aislamiento de bacterias ácido lácticas en lactosuero fermentado. *Nov Sci.* 2007;8(2):326–39.
131. Carolina RL, Jorge FVR. Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Inf Tecnol.* 2016;27(6):115–28.
132. Britania. M.R.S Agar. Vol. s5–X, Notes and Queries. 1878.
133. Macfarland. J. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3ra Edicio. Panamericana EM, editor. 1990. 1990.
134. Botero SPB, Gamboa DCV, Escobar GAB, Toro CR. Detection of lactic acid isomers: Metabolites of lactic acid bacteria isolated from Colombian sourdough. *Rev Argent Microbiol.* 2013;45(3):205–6.
135. Kaewchomphunuch T, Charoenpichitnunt T, Thongbaiyai V, Ngamwongsatit N, Kaeoket K. Cell-free culture supernatants of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. inhibit growth of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Thailand. *BMC Vet Res.* 2022 Dec 1;18(1).
136. Shazadi K, Arshad N. Evaluation of inhibitory and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from vaginal microflora. *Folia Microbiol (Praha).* 2022 Jun 1;67(3):427–45.
137. Md Sidek NL, Tan JS, Abbasiliasi S, Wong FWF, Mustafa S, Ariff AB. Aqueous two-phase flotation for primary recovery of bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) from *Pediococcus acidilactici* Kp10. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2016;1027:81–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.024>
138. Vadhani V. Triple Sugar Iron Agar. HiMedia Lab [Internet]. 2000;(September 2005):2–3. Available from: <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-254458.pdf>
139. Georgieva R, Yocheva L, Tserovska L, Zhelezova G, Stefanova N, Atanasova A, et al. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*

- spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2015;29(1):84–91.
140. Ołdak A, Zielińska D, Rzepkowska A, Kołozyn-Krajewska D. Comparison of Antibacterial Activity of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Two Different Kinds of Regional Cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski Cheese. *Biomed Res Int.* 2017;2017.
 141. Kashyap R, Narayan KS, Vij S. Evaluation of the antimicrobial attribute of bioactive peptides derived from colostrum whey fermented by *Lactobacillus* against diarrheagenic *E. coli* strains. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2023;60(1):211–21. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05606-x>
 142. Banwo K, Sanni A, Tan H. Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. *J Appl Microbiol.* 2013;114(1):229–41.
 143. Cailliez-Grimal C, Edima HC, Revol-Junelles AM, Millièr JB. Short communication: *Carnobacterium maltaromaticum*: The only carnobacterium species in French ripened soft cheeses as revealed by polymerase chain reaction detection. *J Dairy Sci.* 2007;90(3):1133–8.
 144. Khalid NM, Marth EH. Lactobacilli — Their Enzymes and Role in Ripening and Spoilage of Cheese: A Review. *J Dairy Sci* [Internet]. 1990;73(10):2669–84. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78952-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78952-7)
 145. Vijay Simha B, Sood SK, Kumariya R, Garsa AK. Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. *Microbiol Res* [Internet]. 2012;167(9):544–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.01.001>