



**DEPARTAMENTO DE POSGRADOS.
MAESTRÍA EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y
SEGURIDAD ALIMENTARIA.**

***“AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS
DE QUESOS ARTESANALES DE SAN FERNANDO-
AZUAY CONTRA CEPAS PATÓGENAS”.***

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE:**

**“MAGISTER EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA”**

AUTOR: Bioq. ANDREA ABRIL NOVILLO.

DIRECTORA: Ing. MARÍA FERNANDA ROSALES.

CUENCA-ECUADOR

2016

DEDICATORIA:

Por su amor incondicional a Dios, a mis padres, hermanos, cuñado y sobrina.

AGRADECIMIENTO:

Por el apoyo brindado a la Ing. María Fernanda Rosales y a todos los integrantes del proyecto VLIR de plantas medicinales de la Universidad de Cuenca.

RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo el aislamiento de bacterias ácido lácticas de muestras de quesos artesanales obtenidos de la localidad de San Fernando de la provincia del Azuay y la determinación de la actividad antibacteriana a través de pruebas de antagonismos directo, contra los principales patógenos de interés dentro de la industria alimentaria. Se lograron aislar 3 cepas pertenecientes al grupo de las bacterias ácido lácticas (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis* y *Leuconostoc lactis*) las que presentaron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella Enteritis*. Los resultados demuestran su actividad antagónica y podrían ser utilizadas dentro de la industria alimentaria como conservantes.

PALABRAS CLAVES:

Bacterias ácido lácticas, antagonismo, patógenos.

ABSTRACT

This study aims to isolate lactic acid bacteria from samples of cheeses obtained from the town of San Fernando in the province of Azuay and determine of antibacterial activity through antagonisms direct testing against the major pathogens that are of concern within the food industry. It was possible to isolate three strains belonging to the lactic acid bacteria (*Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus brevis*) group, which showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritis*. The results show the antagonistic activity, which could be used as preservatives.in the food industry.

KEYWORDS: Lactic Acid Bacteria, Antagonism, Pathogens.




Translated by:
Lic. Lourdes Crespo

INDICE DE CONTENIDO:

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
Características y clasificación de las bacterias ácido lácticas	2
Actividad antimicrobiana de las BAL.....	2
Microorganismos patógenos dentro de la industria alimentaria	3
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
1. CAPÍTULO I.....	6
1.1. Localización del estudio:	6
1.2. Origen de las muestra.....	6
1.3. Base genética madre	6
1.4. Aislamiento de bacterias ácido lácticas	6
1.5. Identificación	7
1.5.1. Tinción de gram	7
1.5.2. Catalasa	7
1.5.3. Galería API 50 CHL:	7
1.6. Pruebas complementarias	8
1.7. Pruebas de antagonismo directas	8
CAPITULO II.....	9
RESULTADOS	9
CAPITULO III.....	16
DISCUSIÓN.	16
CONCLUSIONES	18
BIBLIOGRAFÍA	19
ANEXOS	21

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Resultados de la identificación microscópica y macroscópica de las muestras de queso artesanal de San Fernando.....	9
Tabla 2 Resultados fermentación de carbohidratos pruebas API.....	10
Tabla 3 Resultados del taxón identificados y el porcentaje de identificación	11
Tabla 4 Resultados de los halos de inhibición de crecimiento mm producidas por las cepas aisladas contra S. aureus, E. Coli y S. enteritis	11
Tabla 5 Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos usados como control de las cepas ATCC.....	12

INDICE DE FIGURAS.

Fig. 1 Tinción de gram microorganismo de interés presentes en las muestras.....	10
Fig. 2 Halos formados de inhibición de <i>L. lactis</i> contra <i>S. aureus</i>	12
Fig. 3 Poder antagónico de las BAL contra <i>S. aureus</i>	13
Fig. 4 Poder antagónico de las BAL contra <i>E. coli</i>	13
Fig. 5 Poder antagónico de las BAL frente <i>S. enteritis</i>	13
Fig. 6 Susceptibilidad de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. enteritis</i> frente a <i>L. lactis</i>	14
Fig. 7 Susceptibilidad de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. enteritis</i> frente a <i>L. brevis</i>	14
Fig. 8 Susceptibilidad de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. enteritis</i> frente a <i>Leuconostoc lactis</i>	14

Abril Novillo Andrea Soledad
Trabajo de graduación.
Ing. María Fernanda Rosales.
Mayo, 2016.

“AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS DE QUESOS ARTESANALES DE SAN FERNANDO-AZUAY CONTRA CEPAS PATÓGENAS”.

INTRODUCCIÓN.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) hoy en día han adquirido mayor importancia debido a su potencial como conservantes naturales, su presencia en los alimentos disminuye la proliferación de bacterias patógenas, causantes enfermedades frecuentemente transmitidas por los alimentos (ETAs) que constituye un problema de salud pública, en el 2015 se ha reportado en el Ecuador alrededor de 2.747 casos según información publicada por del ministerio de salud pública , por lo que resulta de interés la búsqueda de nuevas alternativas de antibacterianos que en el futuro puedan ser consideradas como una fuente natural para la conservación e inocuidad de los alimento.

En el Ecuador como en otros países se consideran como principales microorganismo causantes de ETAs a el *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp* (Ministerio de Salud publica del Ecuador, 2016) que afectan a la inocuidad alimentaria dentro de la industria, comúnmente encontrados en las superficies o maquinaria formando biopelículas.

En la actualidad se busca el remplazo de sustancias químicas usadas para el control de los microorganismos patógenos por formas más naturales que además aporten en la mejora de las características organolépticas de los alimentos.

Las BAL presentan varias formas de antagonismo frente a microorganismos patógenos como la reducción del pH por la producción de ácidos orgánicos, la producción de metabolitos de hidrogeno, bacteriocinas entre otras.

Por la problemática expuesta en el presente trabajo trata de la búsqueda de cepas de BAL nativas, presentes en quesos artesanales del cantón San Fernando de la provincia del Azuay que presenten actividad antibacteriana contra las cepas patógenas frecuentemente encontradas en la industria alimentaria y en un futuro puedan ser usadas como tal o sus componentes

antimicrobianas como fuente de conservantes naturales que favorezcan a la inocuidad de los alimentos.

Características y clasificación de las bacterias ácido lácticas:

Las bacterias ácido lácticas son un grupo diverso de bacterias gram positivas, anaerobias facultativas, no formadores de esporas, de forma bacilar o cilíndrica, incapaces de sintetizar ATP por respiración, carecen de citocromos, porfirinas y otras enzimas del grupo hemo, por lo que son catalasa y oxidasa negativos. La energía celular la obtiene por la fermentación de los carbohidratos produciendo principalmente ácido láctico. (Helmut & Jürgen , 2011)

El sistema de clasificación, las divide por la morfología en bacilos (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*) y cocos (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aereococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*). Una de las características importantes que se toman en cuenta para la clasificación es el modo de fermentación de la glucosa dividiéndolas en homofermentativas y heterofermentativas. (Helmut & Jürgen , 2011) (Heping & Yimin Cai, 2014)

Actividad antimicrobiana de las BAL:

El sistema antagónico de las bacterias ácido lácticas se basa a más de la producción de compuestos ácidos procedentes de la fermentación de los carbohidratos, en metabolitos inhibitorios que se sintetizan en menor cantidad como el hidróxido de oxígeno, metabolitos de del oxígeno, del dióxido de carbono, compuestos aromáticos (acetil aldehído, diacetileno), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), benzoatos y enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y antibióticos. (Vásquez M, Suárez M, & Zapata B, 2009)

El desarrollo en anaerobiosis de las bacterias ácido lácticas, produce varios metabolitos del oxígeno como el peróxido de hidrogeno, aniones superóxido y radicales libres con actividad antibacteriana tanto bactericida como bacteriostática. (Vásquez M, Suárez M, & Zapata B, 2009)

El peróxido de hidrogeno es producido por la oxidación del NADH por medio de la enzima NADH oxidasa, el cual inhibe el crecimiento de *Pseudomona* y *Staphylococcus* sp debido a la producción de radicales libres que actúan sobre los componentes celulares como los lípidos, proteínas y DNA. Las BAL presentes en la leche activa el sistema lactoperoxidasa que cataliza la oxidación de tiocina y la reducción del peróxido de hidrogeno produciendo la acumulación del hipotiocianato el cual oxida a los grupos sulfhidrilo de las proteínas dando lugar a daños en la estructura de la membrana citoplasmática que tiene un efecto bacteriostático contra las bacterias patógenas. (Vásquez M, Suárez M, & Zapata B, 2009) (Adams & Moss, 2005) (Doyle, Beuchat, & Montville)

Uno de los principales factores que produce la inhibición, es la producción de los ácidos orgánicos como metabolitos durante la fermentación como el ácido láctico, ácido propionico y el ácido cítrico, que provocan la reducción del pH. La disociación parcial de los ácidos débiles permite que la parte no disociada atraviese la membrana, produciendo una elevación en el pH del citoplasma con gasto energético, lo que produce la desnaturalización proteica y reducción en la permeabilidad de la membrana celular, alterando a los sustratos enzimáticos. El ácido láctico inhibe las bacterias esporógenas *Staphylococcus aureus* y *Yersinia enterocolitica* es el más eficaz de los ácidos orgánicos. (Doyle, Beuchat, & Montville) (Vásquez M, Suárez M, & Zapata B, 2009) (Lahtinen, Ouwehand, Salminen, & Atte von , 2011)

De la misma forma presenta un papel antagónico las proteínas sintetizadas en los ribosomas de las BAL conocidas como bacteriocinas, son estables a pH ácido o neutro y a temperaturas entre los 50-80°C. Se han determinado aproximadamente 89 bacteriocinas diferentes en función a sus características químicas. Las bacteriocinas actúan uniéndose a la membrana por atracción electrostática, insertándose en la bicapa lipídica, formando poros en la membrana citoplasmática, permeabilizándola permitiendo la salida de iones metabolitos como aminoácidos, fundamentales para la supervivencia de la célula bacteria. (Vásquez M, Suárez M, & Zapata B, 2009)

En varias investigaciones se han encontrado nuevos compuestos no proteicos formados por monómeros hidratados y dímeros cíclicos de aldehído 3 hidroxipropiónico conocido como reuterina producido por *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus collinoides* y *Lactobacillus coryniformis* presenta una actividad antimicrobiana amplia, se forma durante la utilización anaerobia del glicerol, inhibe la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa involucrada en la síntesis del DNA. (Lahtinen, Ouwehand, Salminen, & Atte von , 2011) (Doyle, Beuchat, & Montville)

Microrganismos patógenos dentro de la industria alimentaria:

Los principales microorganismos que afectan a la industria alimentaria y que se reportan con mayor frecuencia en casos de intoxicaciones alimentaria incluyen a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*

Los principales brotes producidos por alimentos obtenidos de registros epidemiológicos señalan como principal microorganismo causante *Salmonella sp.*, evidenciado en varios incidentes como la pandemia de *S. enteritidis* en huevos que ha tenido un impacto estadístico dentro de las enfermedades transmitidas por los alimentos. El género *Salmonella* está compuesto por microorganismos resistentes, que se adaptan a condiciones extremas, crecen en un intervalo amplio de temperatura ($\leq 54^{\circ}\text{C}$) y en un pH óptimo de 6,5 a 7.5 se ha confirmado el crecimiento de cepas silvestres a pH muy bajos, lo que es preocupante para la inocuidad de alimentos

fermentados, encurtidos que deriva a la presencia de cepas ácido tolerantes. (Doyle, Beuchat, & Montville)

Las intoxicaciones alimentarias con *Staphylococcus aureus* son la causa más frecuente de gastroenteritis alrededor del mundo, producidas por la ingesta de una o más enterotoxinas estafilocócicas, se presenta en forma de brotes aislados que afectan a muchas personas, debido a ingerir alimentos mal conservados. (Doyle, Beuchat, & Montville) (Brooks, Butel, & Morse, 2004)

Las cepas de *Escherichia coli* es causa común de diarrea en todo el mundo e infecciones del aparato urinario, dentro de las más patógenas se encuentra la *E.coli* O157 H 7 que produce la colitis hemorrágica, lo que lo sitúa dentro de los más graves patógenos transmitidos por los alimentos, como principal vehículo de transmisión se encuentra involucrado el ganado vacuno, se lo considera como un microorganismo ácido tolerante lo que anula los procesos de acidificación para mantener la inocuidad de los alimentos. (Doyle, Beuchat, & Montville) (Brooks, Butel, & Morse, 2004)

OBJETIVO GENERAL

- Aislar y determinar la actividad antagónica de bacterias ácidos lácticas en quesos artesanales de la zona de San Fernando- Azuay.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar las Bacterias lácticas de muestras de queso de la zona de San Fernando- Azuay.
- Identificar por pruebas bioquímicas las Bacterias ácido lácticas.
- Determinar la actividad antagónica de las Bacterias ácido lácticas contra cepas patógenas (*Salmonella Enteritis* , *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*)

CONCLUSIONES.

- Se logró aislar 3 cepas de BAL perteneciente a las especies de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* de las muestras de quesos artesanales de la localidad de San Fernando de la provincia del Azuay-Ecuador.
- Las pruebas bioquímicas a través del perfil API CH 50 permitieron identificar a las especies teniéndose *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis* y *Leuconostoc lactis*.
- Se determinó la actividad antagónica de *L. lactis*, *L. brevis* y *Leuconostoc lactis* frente a *S. aureus*, *Salmonella enteritis* y *E. coli* resultado activas frente a los patógenos ya que los halos de inhibición son >5mm.

BIBLIOGRAFÍA

- Sorto cruz , I. A., & sotelo villegas, a. (diciembre de 2006). Clasificación de lactobacillus spp. Provenientes de queso fresco artesanal utilizando reacción en cadena de la polimerasa (pcr) y ecor i. Honduras.
- Adams, m. R., & moss, m. O. (2005). *Microbiología de alimentos*. España: acribia s.a.
- Biomérieux. (2002). *Instructivo api 50ch*. Francia.
- Brooks, g., butel, j., & morse, s. (2004). *Microbiología médica de jawez, melnick y aldelberg*. México: el manual moderno.
- Doyle, m., beuchat, l., & montville, t. (s.f.). *Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras*. Acribia s.a.
- Helmut , k., & jürgen , f. (2011). Lactic acid bacteria.
- Heping , z., & yimin cai, c. (2014). Lactic acid bacteria fundamentals and practice. *Springer*.
- Hernández, p. E. (1993). Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. *Microbiología sem sociedad española de microbiología*.
- Jacobsen, c. N., & nielsen, r. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of lactobacillus spp. By in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and environmental microbiology*.
- Jean b. Patel, f. R. (2016). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical and laboratory standards institute, 256*.
- Koneman, e. W., & allen, s. (2008). *Diagnostico microbiologico*. Panamericana.
- Lahtinen, s., ouwehand, a., salminen, s., & atte von , w. (2011). *Lactic acid bacteria*. Crc press.
- Macfaddin, j. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Argentina: panamericana.
- Ministerio de salud publica del ecuador. (abril de 2016). Obtenido de <http://www.salud.gob.ec/direccion-nacional-de-vigilancia-epidemiologica/>

Rushdy , a. A., & goma, e. Z. (2012). Antimicrobial compounds produced by probiotic lactobacillus brevis isolated from dairy products. *Annals of microbiology*.

Vanegas, m. C., martínez, a. J., & gonzález, l. M. (2011). Búsqueda de cepas nativas de *lactobacillus spp* con potencial en bioconservación de alimentos. *Alimentos hoy*, 10.

Vásquez m, s. M., suárez m, h., & zapata b, s. (2009). Use of antimicrobial substances produced by acid lactic bacteria on meat conservation. *Revista Chilena Nutrición*, 64-71.