



DEPARTAMENTO DE POSGRADOS

MAESTRÍA EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD

ALIMENTARIA

***“AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
PRESENTES EN EL SUERO DE QUESOS ARTESANALES DE LA
PROVINCIA DE CAÑAR CONTRA CEPAS PATOGENAS”***

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
“MAGÍSTER EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA”**

AUTOR: BQ. JÉSSICA PRISCILA CALLE LÓPEZ

DIRECTOR: MST. MARÍA FERNANDA ROSALES

CUENCA, ECUADOR

2016

DEDICATORIA.

La presente tesis la dedico a Dios, quien guía mi camino y ha llenado de fortaleza mis pasos.

A mis padres por su sacrificio diario para darme la mejor herencia la educación, por su amor incondicional y las noches en vela junto a mí, por estar siempre con brazos abiertos para cobijarme y enseñarme que los sueños se hacen realidad cada día al despertar, son mi motor y a ellos les debo la mujer que hoy soy.

A mi hermana mi ejemplo y orgullo, en ella veo el esfuerzo y sacrificio al dejar el círculo y lanzarse a la vida, mi enanita bella te adoro gracias por ser mi compañera, amiga y cómplice, el mejor regalo que me han dado mis padres.

A mi amigo, novio y compañero de vida Xavier gracias por cada detalle, por cada abrazo, por cada comida que ha llenado mi estómago y mi alma, tus palabras de aliento, pero sobre todo gracias por no cortar mis alas, siempre hacerme reír y caminar a mi lado.

Cuando tome la decisión de estudiar la maestría mi familia me alentó y hoy les agradezco a ellos, en especial a un luchador, a un guerrero de la luz, tío me hace tanta falta, pero sé que cada rayo de sol que ilumina mi día es un abrazo y cada día de lluvia es la manera de seguir bailando juntos en este mundo.

A todos mis amigos que de alguna manera estaban ahí pendientes para festejar un logro más obtenido en este caminar, de manera especial a Fifa, Moti y sus seis hijos.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora de tesis Ing María Fernanda Rosales por confiarme este proyecto, haberme guiado y ayudado a culminar con éxito el presente trabajo, por su apoyo y colaboración no solo material sino aquella que tiene más valor sus principios y valores.

A todos mis compañeros y jefes del Proyecto MEDPLAN por su apoyo incondicional y préstamo del material y equipos necesarios para la realización de este tema, por brindarme sus palabras de aliento, por su ayuda en momentos cruciales, a mi amiga Andrea por la paciencia.

A las personas que he conocido durante estos dos años, compañeros de aula y algunos hoy llamados amigos, con los que he compartido un tiempo muy valioso y espero no olvidar jamás.

A todas les ofrezco mis más sinceros agradecimientos.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo el de aislar bacterias ácido lácticas de quesos frescos artesanales de la Provincia del Cañar y determinar su capacidad antibacterial. Las muestras fueron recolectadas de diferentes fabricantes y sembradas en agar MRS y M17. A través de pruebas bioquímicas miniaturizadas API 50 CHL, se identificaron dos cepas de BAL, con un 99.8% de tipificación *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* y con 95.3% *Lactobacillus plantarum*. Posteriormente a estas bacterias se les probó su actividad antibacteriana contra *Salmonella Enteritis*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, por pruebas de difusión en agar. Se determinó que *L. paracasei* es efectivo contra Gram + y -, y *L. plantarum* es inhibidor del crecimiento Gram -. Esto es importante desde el punto de vista de la efectividad sobre todo contra bacterias como *Salmonella* que son más difíciles de inhibir su crecimiento debido a su capa de peptidoglucano que las convierte en más resistentes a los compuestos antibacteriales como las bacteriocinas. Finalmente estas cepas de BAL fueron crioconservadas para posteriores estudios.

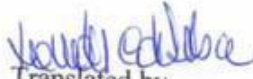
PALABRAS CLAVES: BAL, difusión en agar, Gram, bacteriocina, antibacteriano.

ABSTRACT AND KEYWORDS**ABSTRACT**

The objective of this study was to isolate Lactic Acid Bacteria from fresh artisan cheeses of the Province of Cañar, and determine its antibacterial capacity. The samples were collected from different manufacturers and planted in MRS and M17 Agar. Through API 50 CHL miniaturized biochemical tests, it was possible to identify two LAB (Lactic Acid Bacteria) strains with 99.8% of *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* characterization, and 95.3% *Lactobacillus plantarum*. Thereafter, these bacteria were tested for their antibacterial activity against *Salmonella enteritis*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by Agar diffusion tests. It was determined that *L. paracasei* is effective against Gram + and -; and *L. plantarum* is Gram -, growth inhibitor. This is important from the standpoint of effectiveness, especially against bacteria such as *Salmonella*, whose growth is more difficult to inhibit due to their peptidoglycan layer that turns more resistant antibacterial compounds as bacteriocins. Finally, these LAB strains were cryopreserved for further studies.

KEYWORDS: LAB, Agar Diffusion, Gram, Bacteriocin, Antibacterial.




Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

INDICE DE CONTENIDO

Contenido	
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
PALABRAS CLAVES: BAL, difusión en agar, Gram, bacteriocina, antibacteriano.....	iv
ABSTRAC AND KEYWORDS	v
INDICE DE CONTENIDO	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE TABLAS	viii
INTRODUCCIÓN	1
Generalidades de género <i>Lactobacillus</i>	2
Caracteres morfológicos	2
Actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas	2
Principales efectos benéficos de las bacterias ácido lácticas	3
Cepas patógenas usadas en la actividad antibacteriana	3
OBJETIVO GENERAL:	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPITULO I	5
MATERIALES Y METODOS	5
1.1. Localización del Estudio.....	5
1.2. Origen de las muestras.....	5
1.3. Aislamiento de las bacterias, preparación de las muestras.....	5
1.4. Método microbiológico de aislamiento e identificación de <i>Lactobacillus</i> .	7
1.5. Método de evaluación de actividad antimicrobiana.....	8
CAPITULO II	10
RESULTADOS	10
2.1. Aislamiento e identificación de las bacterias ácido láctico	10

2.2. Perfil Bioquímico de las BAL.	11
2.3. Evaluación de la actividad antibacteriana	12
2.4. Pruebas estadísticas de la inhibición en placa por el método de difusión del agar de las BAL obtenidas contra las cepas de Gram negativos y Gram positivos muestras realizadas por triplicado	13
CAPITULO III	21
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1.Lugares de recolección de las muestras Provincia del Cañar	6
Figura 2. Aislamiento de las muestras sembradas en medios selectivos	6
Figura 3. Preparación de las pruebas bioquímicas API 50	7
Figura 4. Preparación del ensayo de actividad antibacteriana	9
Figura 5. Tinción de Gram muestra N° 4.....	10
Figura 6. Tinción de Gram muestra N° 1	10
Figura 7. Resultado del API TEST para muestra MRS N° 4 el perfil fue Lactobacillus paracasei ssp con un 99.8% de tipificación.....	11
Figura 8. Resultado del API TEST para muestra M17 N° 1 el perfil fue Lactobacillus plantarum con un 95.3% de tipificación.....	11
Figura 9. Pruebas de actividad antibacteriana en Lactobacillus paracasei contra Salmonella enteritis y Staphylococcus aureus	12
Figura 10. Pruebas de la actividad antibacteriana en Lactobacillus plantarum contra Salmonella enteritis y Listeria monocytogenes.....	13
Figura 11. Cepas de Listeria monocytogenes vs Salmonella enteritis con respecto a Lactobacillus plantarum (ensayo por triplicado)	15
Figura 12. Cepas de Salmonella enteritis vs Staphylococcus aureus con respecto a Lactobacillus paracasei (ensayo por triplicado).....	18
Figura 13. Lactobacillus plantarum vs Lactobacillus paracasei con respecto a la cepas de Salmonella enteritis	20

Figura 14. Se indica después del análisis estadístico en la prueba de hipótesis que no existe diferencia significativa entre las muestras.....	20
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Codificación de las muestras de quesos para elaborar los ensayos	5
Tabla 2. Resultados obtenidos por el método de difusión del agar, halos de inhibición resultantes por triplicado usando <i>Lactobacillus paracasei</i> contra las cepas de <i>Salmonella enteritidis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	13
Tabla 3. Resultados obtenidos por el método de difusión del agar, halos de inhibición resultantes por triplicado usando <i>Lactobacillus plantarum</i> contra las cepas de <i>Listeria monocytogena</i> y <i>Salmonella enteritidis</i>	13

Calle López Jéssica Priscila

Trabajo de graduación

Ing. María Fernanda Rosales

Mayo 2016

“AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRESENTES EN EL SUERO DE QUESOS ARTESANALES DE LA PROVINCIA DE CAÑAR CONTRA CEPAS PATÓGENAS”

INTRODUCCIÓN:

Las bacterias del ácido láctico (BAL) han desempeñado un rol importante en la tecnología de los alimentos y tienen una larga historia debido al uso dado por el hombre para la producción de comestibles y la preservación de los mismos ya que su presencia disminuye la proliferación de bacterias patógenas que son los principales culpables de intoxicaciones alimentarias. Esto representa una problemática de salud que ha dado paso a la investigación de nuevos métodos para conservación de los alimentos con componentes naturales que se incorporan al alimento para garantizar su seguridad.

Las bacterias ácido lácticas contribuyen de manera que las características organolépticas de los alimentos no se alteran, además generan en los mismos ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos debido a su marcada capacidad antagonista, se ha podido comprobar que algunas cepas de bacterias lácticas, entre ellas las del género *Lactobacillus*, son beneficiosas para la salud, tanto humana como animal (probióticos). Ambos efectos beneficiosos, ocasionados por su capacidad antagónica, se basan en la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores, entre los que cabe mencionar el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y otros derivados del metabolismo del oxígeno, así como compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y otros.

En los tiempos actuales la problemática a nivel salud dada por las intoxicaciones alimentarias ha dado paso a la investigación de diferentes mecanismos para asegurar la calidad de dichos alimentos, ya sea retardando el crecimiento de microorganismos o en el mejor de los casos matándolos por completo. Es por ello que surge la idea de estudiar algunos tipos de antimicrobianos o conservantes naturales y así contribuir en mayor medida a eliminar los productos químicos de los alimentos y de esta manera podemos aportar con la investigación de

BAL aisladas de las muestras de queso que pudieran tener el efecto antibacteriano contra alguna cepa patógena. (Blackburn, 2006; Doyle, Beuchat, & Montville, 2001)

Generalidades de género *Lactobacillus*.

El término bacterias lácticas engloba a un grupo heterogéneo de microorganismos que se ubican en la familia Lactobacillaceae cuya característica definitoria es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares que en cantidades suficientemente elevadas podría causar inhibición o total destrucción de otros microorganismos.

Las bacterias lácticas se han venido utilizando inadvertidamente durante miles de años para la producción de alimentos tales como queso y yogur. Sin embargo, no fue hasta mediados del siglo XIX cuando Louis Pasteur demostró que la producción de ácido láctico en fermentaciones se debía a la acción de microorganismos (fermentos lácticos). El aislamiento y obtención de un cultivo puro de *Bacterium lactis* por Joseph Lister marcó el inicio del estudio microbiológico de las bacterias lácticas.

Las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico o bien, ácidos láctico y acético y también pueden producir otras sustancias inhibitoras tales como: diacetilo, peróxido de hidrógeno, reuterina (b- hidroxipropionaldehído) y bacteriocinas. Estas últimas son producidas ribosomalmente como proteínas o polipéptidos precursores que, en su forma activa, ejercen un efecto antibacterial contra un espectro limitado de bacterias estrechamente relacionadas. (De Vos, Whitman, & Bergey, 2009)

Caracteres morfológicos.

El género *Lactobacillus* se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, largos cortos, o cocos Gram positivos que se dividen como bacilos solamente en un plano, produciendo cadenas o tétradas de forma ocasional y filamentos, falsamente llamados ramificados. (Ingraham et al., 1998), aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos coryneformes; lo cual hace que se puedan confundir con géneros aislados habitualmente de origen clínico. Los grandes bacilos homofermentativos presentan gránulos internos revelados por tinción de Gram o por tinción con azul de metileno. (Blackburn, 2006)

Actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas se comportan como inhibitoras de otros microorganismos en la mayoría de los casos, y es precisamente este comportamiento la clave para estudiar su calidad de conservación de algunos productos alimenticios, un factor clave es la producción de ácido láctico y acético junto con la baja de pH lo que inhibe el crecimiento y supervivencia microbiana.

Muchas cepas de *Lactobacillus* forman sustancias antimicrobianas inhibidoras del crecimiento de otros microorganismos "in vivo". Las bacterias ácido lácticas preservan los alimentos como resultado de un conocimiento competitivo producto de su metabolismo y de la producción de bacteriocinas, que son péptidos o proteínas bactericidas generalmente activas frente a especies relacionadas con el organismo que la produce. Es de gran importancia para la industria alimentaria ya que podría considerarse como un conservante natural, en la actualidad una de ellas muy reconocida es la nisina producida por cepas de *Lactococcus lactis* es usada por la industria. (Adams M. R, Moss, & Ramis Verges, 1997)

Principales efectos benéficos de las bacterias ácido lácticas.

Se ha identificado muchos beneficios producidos por las bacterias ácido láctico llegando a ser efectivos organismos probióticos con lo que tienen una relación directa con los alimentos fermentados, además debemos resaltar su habilidad de adherirse a las células, el poder excluir o reducir la adherencia patógena, su resistencia y multiplicidad, su capacidad para producir bacteriocinas antagonistas al crecimiento patógeno y formar una flora balanceada.

Es necesario destacar las posibilidades terapéuticas de las bacterias ácido lácticas que pueden ser útiles en el tratamiento de patologías infecciosas, como en la prevención de infecciones urinarias, para el tratamiento de diarreas infantiles o del viajero ya que tienen función protectora de la microflora del intestino, así como para las relacionadas con el consumo de antibióticos, en el tratamiento del estreñimiento y en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, dada su capacidad de modular la flora intestinal ya que nuevas investigaciones las han orientado a mecanismos con efectos antitumorales. (Adams M. R et al., 1997)

Cepas patógenas usadas en la actividad antibacteriana.

- ***Staphylococcus aureus.***

Es un coco Gram-positivo que forma células de 1 um de diámetro aproximadamente, forma agrupaciones irregulares semejantes a un racimo de uvas. Son catalasa-positivo, oxidasa-negativo, anaerobios facultativos. Es un mesófilo típico con un intervalo de temperatura de crecimiento entre 7 y 48°C, óptima a 35 y 40°C.

La producción de la enterotoxina está relacionada a esta especie, aunque también se la ha relacionado con *Staphylococcus intermedius* y *Staphylococcus hyicus*. Como enfermedad de tipo relativamente benigno y de corta duración, la intoxicación alimentaria. (Blackburn, 2006)

- ***Listeria monocytogenes.***

Es un organismo Gram-positivo, anaerobio facultativo, catalasa-positivo, oxidasa-negativo. Morfología es de cocoide a bacilar cultivadas a 20 – 25°C, con alto intervalo de temperatura para su crecimiento desde 0 a 42°C, siendo lo óptimo entre 30 y 35°C. La listeriosis humana es en mayor problema debido a los alimentos que son la fuente principal de infección, se ha identificado a *L. monocytogenes* como el principal causante de esta infección que aunque poco frecuente tiene elevada tasa de mortalidad en población de riesgo (embarazadas, niños, personas adultas y con sistema inmunológico alterado). Las fuentes de carne y pescado son las que tienen mayor significancia y presentan niveles altos de este patógeno.(Adams M. R et al., 1997; Doyle et al., 2001)

- ***Salmonella.***

De la familia de las enterobacteriaceae, son bacilos Gram-negativo, facultativamente anaerobios, catalasa-positivos, oxidasa-negativos, temperatura de crecimiento de 5 hasta 47°C con crecimiento óptimo a 37°C. Son termosensibles y destruidas fácilmente a temperatura de pasteurización. Se divide en dos especies *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*, siendo los serotipos S. Enteritidis y Thyphimurium los de mayor presencia en infecciones de salmonelosis. Se ha asociado a S. Enteritidis el consumo de huevos contaminados y carne de aves, mientras que S. Thyphimurium al consumo de carne de cerdo o bovino.(Adams M. R et al., 1997; Doyle et al., 2001)

OBJETIVO GENERAL:

Aislamiento e identificación de BAL presentes en el suero de quesos artesanales de la provincia del Cañar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Recolectar las muestras requeridas para el presente estudio provenientes de las queserías artesanales más representativas de la provincia del Cañar.
- Realizar el aislamiento de BAL de las muestras de quesos e identificación por medios químicos.
- Determinar la actividad antibacteriana de BAL en cepas patógenas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 , *Salmonella Enteritis* ATCC 1408 y *Listeria monocytogenes*)
- Crioconservar las cepas purificadas para ensayos posteriores.

CONCLUSIONES

- Se cumplieron los objetivos iniciales de este trabajo es decir el aislamiento e identificación de bacterias ácido láctico (BAL) presentes en el suero de quesos artesanales recolectados en diferentes queserías de la provincia del Cañar.
- Identificación de las BAL por medios bioquímicos en este caso por medio de la galería API 50 para dos muestras elegidas de las diez obtenidas con las que se prosiguió el método de inhibición antimicrobiana.
- Determinación de la actividad antibacteriana de BAL en cepas patógenas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enteritis* ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313).
- Crioconservación de las cepas iniciales o madres, y de las cepas aisladas y purificadas para ensayos posteriores que podrían ser más específicos en cuanto a determinar las bacteriocinas se refiere.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams M. R, Moss, M. O., & Ramis Verges, M. (1997). *Microbiología de los alimentos: A.R. Adams, M.O. Moss ; tr. Manuel Ramis Verges*. Zaragoza: Acribia.
- Anas, M., Eddine, H. J., Mebrouk, K., & others. (2008). Antimicrobial activity of Lactobacillus species isolated from Algerian raw goat's milk against Staphylococcus aureus. *World J Dairy Food Sci*, 3(2), 39–49.
- BACTERIOCIN, O. (2009). Aislamiento de Lactobacillus plantarum LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae*, 16(1), 75–82.
- Blackburn, C. de W. (Ed.). (2006). *Food spoilage microorganisms*. Boca Raton, Fla: CRC Press.
- De Vos, P., Whitman, W. B., & Bergey, D. H. (Eds.). (2009). *The Firmicutes* (2. ed). Dordrecht: Springer.
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R., & Montville, T. J. (2001). *Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras*. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Gudiña, E. j., Rocha, V., Teixeira, J. a., & Rodrigues, L. r. (2010). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from Lactobacillus paracasei ssp. paracasei A20. *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), 419-424. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02818.x>
- Ingraham, J. L., Ingraham, C. A., Prentiss, H., Nieto, J. J., Quesada, E., & Ventosa, A. (1998). *Introducción a la microbiología*. Barcelona; México: Reverté.
- Juodeikiene, G., Bobinas, C., Eidukonyte, D., Urbonaviciene, D., Bartkiene, E., & Viskelis, P. (2012). *Fermentation processes using lactic acid bacteria producing bacteriocins for preservation and improving functional properties of food products*. INTECH Open Access Publisher. Recuperado a partir de <http://cdn.intechweb.org/pdfs/26396.pdf>
- Karska-Wysocki, B., Bazo, M., & Smoragiewicz, W. (2010). Antibacterial activity of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Microbiological Research*, 165(8), 674-686. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.008>

Katusic, A. (2002). *Capacidad antagonista frente a listeria monocytogenes de dos sustancias tipo bacteriocina utilizadas en combinación con NaCl y CO2*. Tesis para optar el grado de Licenciado en Ingeniería de alimentos. Universidad Austral De Chile Facultad De Ciencias Agrarias Escuela De Ingeniería En Alimentos. Valdivia, Chile. Recuperado a partir de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2002/fam381c/doc/fam381c.pdf>

Ming, L., Zhang, Q., Yang, L., & Huang, J.-A. (2015). Comparison of antibacterial effects between antimicrobial peptide and bacteriocins isolated from *Lactobacillus plantarum* on three common pathogenic bacteria. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(4), 5806-5811.

Oguntoyinbo, F. A., & Narbad, A. (2015). Multifunctional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from fermented cereal foods. *Journal of Functional Foods*, 17, 621-631. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.022>

Suárez M, H., Francisco, A. de, & Beirão, L. H. (2008). INFLUENCIA DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR *Lactobacillus plantarum* LPBM10 SOBRE LA VIDA ÚTIL DE FILETES DEL HÍBRIDO DE CACHAMA *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* EMPACADO AL VACÍO: INFLUENCE OF BACTERIOCINS PRODUCED BY *Lactobacillus plantarum* LPBM10 ON SHELF LIFE OF CACHAMA HYBRID FILLETS *Piaractus rachypomus* x *Colossoma macropomum* VACUUM PACKAGED. *Vitae*, 15(1), 32-40.