

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS *Lactobacillus s.p* y LEVADURAS A PARTIR DE
PRODUCTOS LACTEOS ARTESANALES Y EVALUACION DE LA CAPACIDAD
ANTAGONICA *IN VITRO*.**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
BOGOTA COLOMBIA
2010**

**TRABAJO DE GRADO
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**

AISLAMIENTO DE BACTERIAS *Lactobacillus s.p* y LEVADURAS A PARTIR DE PRODUCTOS LACTEOS ARTESANALES Y EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTAGONICA *IN VITRO*.

FELIPE ANDRES RAMIREZ MUÑOZ

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
BOGOTA COLOMBIA
2010**

AISLAMIENTO DE BACTERIAS *Lactobacillus s.p* y LEVADURAS A PARTIR DE PRODUCTOS LACTEOS ARTESANALES Y EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTAGONICA *IN VITRO*.

Resumen

Dado el auge de los productos probióticos en la industria de alimentos es de importancia la investigación de nuevas cepas con características prebióticas y antagonicas sobre diferentes microorganismos patógenos y alteradores de las propiedades fisicoquímicas de los alimentos, es por esta razón que el objetivo de este estudio es la evaluación *in Vitro* de la posible actividad antagonica de las cepas de *Lactobacillus sp.* aisladas a partir de productos lácteos en la región cundiboyacense como yogurt, quesos y kumis, para esto se procedió a realizar aislamientos a partir de los productos en medio MRS para aislar las BAL y se procedió a su identificación bioquímica mediante la técnica de microplaca para evidenciar la capacidad de fermentación de 4 azúcares (trealosa, melibiosa, rhamnosa y lactosa), se evaluó su reacción a la catalasa y oxidasa al igual que su tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl (3.5, 4.5, 5.5%p/v) la capacidad antagonica se realizo mediante el ensayo de Ritter enfrentando las cepas aisladas a cuatro microorganismos patógenos y alteradores en productos lácteos (*Salmonella thipi*, *E.coli ATCC 8739*, *Penicillium sp* y *Aspergillus niger*). Como resultado de estos procesos se encontraron 6 cepas diferentes de *Lactobacillus s.p.*, que no presentaron una actividad antagonica importante contra las cepas evaluadas.

Introducción: En la actualidad el desarrollo de nuevas tecnologías en la producción de alimentos se ha convertido en un campo muy amplio, dando lugar a nuevos procesos productivos y al uso de nuevos métodos para garantizar una mejor calidad y aumentar los beneficios obtenidos por los consumidores.

En la industria se usan cultivos iniciadores en una gran variedad de procesos, los más destacados o comunes son las fermentaciones, entre las que se encuentran las de los lácteos, uno de los productos más adquiridos por los consumidores. En estos procesos las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son bastante usadas gracias a la capacidad que tienen para inhibir el desarrollo de algunos microorganismos alteradores, diferentes géneros de *Lactobacillus s.p* presentan estas características, algunos de estos géneros son: *L. plantarum* y *L. sanfranciscus*; estos microorganismos pueden producir una gran variedad de compuestos como: ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y otros compuestos de bajo peso molecular, algunos muestran una fuerte actividad antifúngica, este tipo de metabolitos no premien el desarrollo de otros microorganismos dando una vida útil más larga a los alimentos, es por eso que se les usa en los procesos de biopreservación, además presentan un efecto benéfico en la microflora gastrointestinal humana. Estos microorganismos se conocen como probióticos y pueden ser aislados de diferentes productos lácteos y cárnicos frescos o madurados (1-3).

Es importante el aislamiento y estudio de las cepas de *Lactobacillus s.p* nativas de las diferentes regiones, ya que son un tipo de microorganismos con una amplia gama de aplicaciones y sus características pueden variar en todas las zonas, por lo cual su investigación toma un gran valor en la búsqueda de nuevas tecnologías y procesos.

Lactobacillus s.p es una de los géneros probióticos más importantes y se encuentra casi en cualquier nicho, o en cualquier lugar donde se encuentren carbohidratos disponibles, se conocen mas de 140 especies diferentes que incluyen bacterias Gram positivas, sin movilidad, catalasa negativas, no esporuladas y que pueden desarrollarse en ambientes microaerófilos o anaeróbicos, pueden presentar formas espiraladas o cocobacilares bajo ciertas condiciones (4-5,6) también hay reportes y estudios que demuestran que hay variedades de levaduras que presentan actividades similares a las de las BAL, y que pueden ser ampliamente usadas como probióticos por sus características de resistencia a pH bajo, altas concentraciones de sales biliares y reducción del colesterol entre otros.

La capacidad antagónica de las BAL, y por ende de los *Lactobacillus s.p* es atribuida a sus productos metabólicos, ya que al fermentar los hidrocarburos producen una amplia variedad de sustancias con acción antimicrobiana como el ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y péptidos de bajo peso molecular llamados bacteriocinas. Sin embargo también se puede dar una actividad por la competencia por los nutrientes del ambiente en que se encuentran (1, 6-9)

En este proyecto se busco aislar cepas *Lactobacillus s.p* nativas que presentaran capacidad antagónica frente a diferentes microorganismos alteradores de los alimentos, con el fin de evaluar y encontrar cepas que puedan llegar a ser usadas como un inóculo iniciador para nuevos alimentos en futuros proyectos y que a su vez mejore las características y tiempo de vida del producto, Para esto se realizaron aislamientos a partir de cinco productos de origen artesanal y semi-industrial de la región Cundiboyacence, se procedió a la identificación de los géneros de *Lactobacillus s.p*. y se realizaron pruebas de capacidad antagónica enfrentando a las BAL contra dos bacterias patógenas y dos hongos.

Justificación-Planteamiento del Problema:

Se ha visto un aumento en la adición de Bacterias Acido Lácticas (BAL) en productos comerciales reconocidos, con el fin de dar un valor agregado al producto y a la vez mejorar los procesos y aumentar la estabilidad y tiempo de conservación de los productos, sin embargo para los pequeños productores artesanales, esto es una tarea casi imposible, ya que no cuentan con los recursos físicos y económicos para realizar estas tareas, lo cual afecta directamente la competitividad de sus productos al enfrentarse con marcas que han monopolizado los mercados y adicionalmente presentan un alimento mas duradero y con menor riesgo de contaminación.

Es por esta razón que se propone realizar una búsqueda, aislamiento e identificación bioquímica de cepas nativas usadas en productos lácteos artesanales como yogurt y quesos, adicionalmente realizar una evaluación *in vitro* para identificar las cepas que puedan presentar una actividad antagónica frente a cepas microbianas reconocidas como alteradoras o contaminantes en los productos lácteos tales como: *Salmonella thipi*, *E.coli* ATCC 8739, *Penicillium sp* y *Aspergillus niger*. Esto con el fin de encontrar cepas nativas que puedan ser usadas en futuros productos asegurando una mejor calidad, mayor duración, mejor resistencia a contaminación microbiana y además presenten actividades benéficas para la salud de los consumidores, lo cual podría mejorar el nivel competitivo de los productores artesanales, que en muchos casos dependen de esta labor como única fuente de ingresos

Marco Teórico

En la actualidad hay muchos productos lácteos artesanales, que en su composición cuentan con diferentes clases de microorganismos entre los cuales se encuentran las Bacterias Acido Lácticas (BAL), son también comunes en otros alimentos como carnes maduradas y hortalizas, estas BAL pueden presentar un gran potencial como microorganismos probióticos, ya que se consideran microorganismos seguros para la salud y sus metabolitos pueden causar efectos benéficos para la salud y resistencia del organismo humano o animal (10). Desde hace muchos años se han relacionado con efectos benéficos de la salud, hoy en día por diferentes estudios alrededor del mundo se conoce que mejoran el tracto gastrointestinal de los seres humanos o animales, evitando el desarrollo de microorganismos patógenos, ya que estimulan el sistema inmunológico y por consiguiente, la producción de anticuerpos (2). Como representantes de estas características se han reconocido bacterias como: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus lactis* y *Leuconostoc sp.* (11-13).

Dentro de la definición de probióticos también se pueden encontrar: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* y *Escherichia coli* no patógenos, así como levaduras del género *Saccharomyces s.p.* estos son los géneros más representativos de las BAL. La descripción general ubica a las BAL en el grupo de las bacterias Gram positivas, siendo la mayoría bacilos delgados Gram positivos que se pueden presentar unidos en cadenas largas, muchos no presentan movilidad, aunque existen algunos que presentan flagelos peritricos, no son esporulados, y su reacción a catalasa y oxidasa es negativa (6,11-13).

Presentan un metabolismo fermentativo produciendo ácido láctico como el producto final de la fermentación de los azúcares como; glucosa y lactosa por la vía de Embden-Meyer (glucólisis) y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO₂ por la vía del ácido-6- Fosfogluconico. Requieren para su desarrollo de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas, por esta razón son tan abundante en la leche y sus derivados (6, 11-13). Se pueden clasificar según el tipo de fermentación que realizan como homofermentativos y heterofermentativos.

Muchos de estos microorganismos son considerados como probióticos ya que cumplen con características como: ser habitante normal del tracto intestinal humano, no ser patógenos ni tóxicos, deben sobrevivir al ambiente ácido del estomago y a las sales biliares del duodeno, además de presentar una capacidad de adherencia a las células epiteliales y deben adaptarse a la flora intestinal sin desplazar a los microorganismos nativos, deben producir sustancias antimicrobianas y mejorar las funciones inmunes. Estas son las características que debe presentar un probióticos, y muchas de las BAL las cumplen (10). Además es sabido por investigaciones previas que las BAL pueden presentar actividad antagónica al enfrentarlas a cepas patógenas como *Salmonella enteritidis* (11-13). Existen muchos mecanismos por los cuales un microorganismo puede presentar una interacción negativa con otros, competencia por espacio, nutrientes, una tasa de crecimiento mayor o incluso una forma más eficaz de captar alimentos. Con respecto a las BAL su actividad antagónica o antimicrobiana a sido atribuida a la producción y acumulación de los productos de la fermentación como ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrogeno. Además otro factor al cual es atribuida esta característica es la producción de bacteriocinas (6).

Las bacteriocinas son sustancias extracelulares diferentes a los antibióticos, que son producidas de forma natural por algunas especies bacterianas como *Lactobacillus plantarum*, estas bacteriocinas exhiben una actividad inhibitoria frente a diferentes especies alterantes o patógenas (14). Se han obtenido diferentes bacteriocinas producidas por BAL, y estas presentan espectros de inhibición específicos por algunos microorganismos, estas son usadas para inhibir el crecimiento de bacterias indeseables específicas y para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos y patógenos como *Listeria* entre otros (15).

Estos microorganismos resultan ser de una vital importancia dada la utilidad a nivel industrial, asegurando la estabilidad de los productos, manteniéndolos libres de contaminantes y alteradores. En este estudio se busca aislar e identificar cepas nativas a partir de productos lácteos artesanales que tengan las anteriores características y se puedan usar en una producción dando los valores agregados a los alimentos ya descritos.

Objetivos:

General: Aislar *Lactobacillus s.p* y levaduras a partir de productos lácteos artesanales y evaluar su capacidad antagónica *In vitro*.

Específicos:

- Identificar bioquímicamente los grupos microbianos pertenecientes a *Lactobacillus s.p* y Levaduras a partir de los aislamientos obtenidos de los productos artesanales.
- Evaluar el efecto antagónico de las cepas aisladas frente a *Salmonella*, *E.coli*, *Aspergillus* y *Penicillum sp*.
- Evaluar la capacidad de producción de metabolitos extracelulares por parte de las cepas aisladas e identificadas como *Lactobacillus s.p*

Metodología:

4.1 Obtención de muestras:

Las muestras fueron tomadas a partir de cinco productos lácteos elaborados artesanalmente (queso doble crema, queso tipo paipa, kumis y yogurt) por diferentes establecimientos de producción artesanal escogidos al azar en la región Cundiboyacence, siguiendo este protocolo se realizaron tres muestreos y los productos seleccionados fueron transportados en refrigeración a 10°C hasta el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana.

Las muestras recolectadas fueron clasificadas bajo la siguiente nomenclatura:

Producto seleccionado	Codificación
Kumis	Ku
Queso tipo doblecrema	Qd
Queso tipo paipa	Qp
Yogurt "la cabaña"	Yl
Yogurt "peslac"	Yp

4.2 Aislamiento de las cepas:

Se tomaron 10mL o 10 g del producto, se llevaron a 90 mL de agua peptonada 1% (P/V) y se procedió a realizar diluciones seriadas, hasta 10^{-10} , se hicieron siembras en superficie en agar MRS (anexo 1) y se incubaron por 48h a 37° C en condiciones de microaerofilia (10% CO₂), se realizó una identificación morfológica por tinciones de Gram, una vez terminado el proceso de incubación.

Se aislaron por resiembras en agar MRS las colonias presuntivas que presentaron distintas morfologías tanto en las cajas de petri como en las observaciones microscópicas (11-13, 16-18).

4.3 Pruebas bioquímicas:

La identificación bioquímica de los tipos de las cepas del género *Lactobacillus s.p* se realizó por medio de pruebas de azúcares fermentables (trealosa, melobiosa, rhamnosa y lactosa) por medio de la técnica de microplaca (11-13,18-20) Para esto se procedió a la preparación de 10 mL de cada uno de los azúcares al 1%, 10 mL de rojo fenol al 0.1%. Se realizó una solución de las colonias aisladas presuntivas de *Lactobacillus s.p* en solución salina al 0.85% (p/v) hasta alcanzar una concentración igual al tubo N°3 de la escala de Macfarland (9×10^8 cel/mL), la asimilación o fermentación de los azúcares se evidenciará por un viraje de color del indicador rojo de fenol. Adicionalmente se realizaron pruebas de catalasa, oxidasa y tolerancia a tres concentraciones diferentes de NaCl (3.5 %, 4.5% y 5.5%).

Para evaluar la tolerancia a concentraciones de NaCl, se utilizó el método ecométrico para lo cual se sembraron las cepas de *Lactobacillus s.p* previamente aisladas, en medio MRS suplementado con tres concentraciones de NaCl (3.5 %, 4.5% y 5.5% p/v) y se compararon contra un control positivo sembrando las cepas en medio MRS sin suplementar. Posteriormente se estableció el valor del Índice de Crecimiento Absoluto (ICA). Las pruebas se realizaron por triplicado (20)

4.4 Antagonismo: Ensayo de Ritter

Para la evaluación de la capacidad antagonica de las Bacterias aisladas de los productos lácteos se realizaron enfrentamientos directos de aquellas cepas que pertenecían al género *Lactobacillus s.p* según las pruebas de identificación bioquímica frente a bacterias (*Salmonella tphi* y *E.coli* ATCC 8739) y hongos (*Aspergillus niger* y *Penicillium s.p*). Las cepas patógenas fueron obtenidas del cepario de bacterias y hongos del departamento de microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana.

4.4.1 Ensayos frente a Bacterias:

Se realizó una suspensión a partir de colonias puras crecidas previamente en agar MRS de las bacterias previamente aisladas e identificadas bioquímicamente como pertenecientes al género *Lactobacillus s.p* y las levaduras aisladas en solución salina 0.85% (p/v) hasta alcanzar una concentración correspondiente al tubo N° 2 de la escala de Macfarland. Estas suspensiones fueron impregnadas en discos de papel filtro estéril, posteriormente se hicieron siembras masivas en agar nutritivo (anexo 2) de las cepas de *Salmonella tphi* y *E.coli* ATCC 8739, y se procedió a colocar los discos impregnados sobre el agar previamente sembrado. Las cajas fueron incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48h bajo condiciones de aerobiosis y microaerofilia. (11-13 ,21).

4.4.2. Ensayos frente a hongos:

Con las suspensiones previamente preparadas de las cepas de *Lactobacillus sp* y levaduras en solución salina se impregnaron discos de papel filtro estéril y se dispusieron en las cajas de petri con agar PDA (ANEXO 3) en las que se sembraron por punción central cultivos puros de cepas de *Aspergillus niger* y *Penicillium s.p.* Las cajas se incubaron a $35\pm 2^{\circ}$ en condiciones de aerobiosis, realizando observaciones del crecimiento cada 24h durante 7 días. (21,11-13)

4.5 Evaluación de la producción de metabolitos extracelulares:

A partir de colonias puras de *Lactobacillus s.p* previamente aisladas e identificadas y crecidas en agar MRS se realizó una suspensión con un volumen de 5 mL en caldo MRS con una concentración del tubo N° 2 de la escala de Macfarland, se llevó a incubación a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, 150 r.p.m durante 12h. Transcurrido el periodo de incubación se procedió a centrifugar 5000 r.p.m a 4°C por 20 minutos.

Adicionalmente se sembró masivamente una suspensión de *Salmonella s.p* y de *E. coli* con una concentración de tubo N°2 de la escala de Macfarland, en agar Mueller Hinton (ANEXO 4) se abrieron con pipeta pasteur 4 pozos, en dos de los cuales se sembró el sobrenadante producto de la centrifugación y se utilizó como control negativo agua peptonada y otro como control positivo con un sensidisco de gentamicina, se incubó a 37°C por 24h y se evaluó la presencia de halos de inhibición. La prueba se llevó a cabo por triplicado. (11-13)

4.6 diseño estadístico

El análisis descriptivo incluyó el cálculo de las frecuencias, porcentajes y sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC95%) para las variables cualitativas; se calcularon medidas de tendencia y de dispersión para las variables cuantitativas.

Para todo el análisis se considera un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, la base de datos se elaborará en el programa Microsoft Office Excel y el análisis se realizará con el paquete estadístico STATA 8.0.

Resultados y Discusión:

Los resultados obtenidos en las etapas experimentales del proyecto se presentan a continuación haciendo uso de herramientas gráficas y estadísticas que facilitan su comprensión.

En la Tabla 1 y Figura 1. Se presenta el recuento de la población bacteriana de cada producto, en cada uno de los tres muestreos realizados. Se observa que el recuento de la población bacteriana del Qd y el Ku tienen un comportamiento similar, es decir, en el primer muestreo se presentan los valores más elevados, los cuales descienden en el segundo muestreo. Mientras que el recuento del Qp y el Yl mostró los valores más bajos en el primer muestreo, los cuales aumentaron en el segundo hasta obtener los valores más elevados en el tercero. El recuento del Yp fue similar en el primer y segundo muestreo con un descenso en el tercero. En relación con el promedio de los tres muestreos se observa que el recuento del queso doble crema y el kumis presentaron los valores más elevados.

Los recuentos encontrados, coinciden con los reportados para productos lácteos frescos como quesos (6), sin embargo en la primera etapa de muestreo los productos Ku y Qd, se procesaron en una fecha cercana a la caducidad de los productos, lo cual evidentemente altero el recuento elevándolo por el aumento de la población bacteriana, esto se comprueba al ver los datos recolectados en los siguientes dos muestreos. En la figura 1 se representan los recuentos, en el eje X se presentan las cepas aisladas y en el eje Y se informa el logaritmo en base 10 de los recuentos presentados en la tablas 1, el color de las barras representa a cada muestreo tal como se explica en la leyenda de la figura 1.

Tabla 1. Recuento en caja de la población bacteriana de cada cepa, según muestreo

Producto	Muestreo 1		Muestreo 2		Muestreo 3		Promedio de mediciones			
	UFC/ml	log	UFC/ml	log	UFC/ml	Log	UFC/ml		Log	
							$\bar{x} \pm DE$		$\bar{x} \pm DE$	
Queso crema doble (Qd)	2,46E+13	13,4	3,20E+08	8,5	4,10E+07	7,6	4,92E+12	$\pm 1,42E+13$	12,7	$\pm 3,1$
Queso paipa (Qp)	1,40E+08	8,1	2,00E+08	8,3	5,30E+08	8,7	1,74E+08	$\pm 2,10E+08$	8,2	$\pm 0,3$
Yogurt "peslac" (Yp)	5,40E+08	8,7	6,50E+08	8,8	1,80E+08	8,3	2,74E+08	$\pm 2,46E+08$	8,4	$\pm 0,3$
Yogurt "la cabaña" (Yl)	2,10E+07	7,3	4,70E+08	8,7	6,70E+08	8,8	2,32E+08	$\pm 3,32E+08$	8,4	$\pm 0,8$
Kumis (Ku)	1,50E+13	13,2	1,80E+09	9,3	1,80E+08	8,3	3,00E+12	$\pm 8,66E+12$	12,5	$\pm 2,6$

\bar{x} : Promedio DE: Desviación Estándar

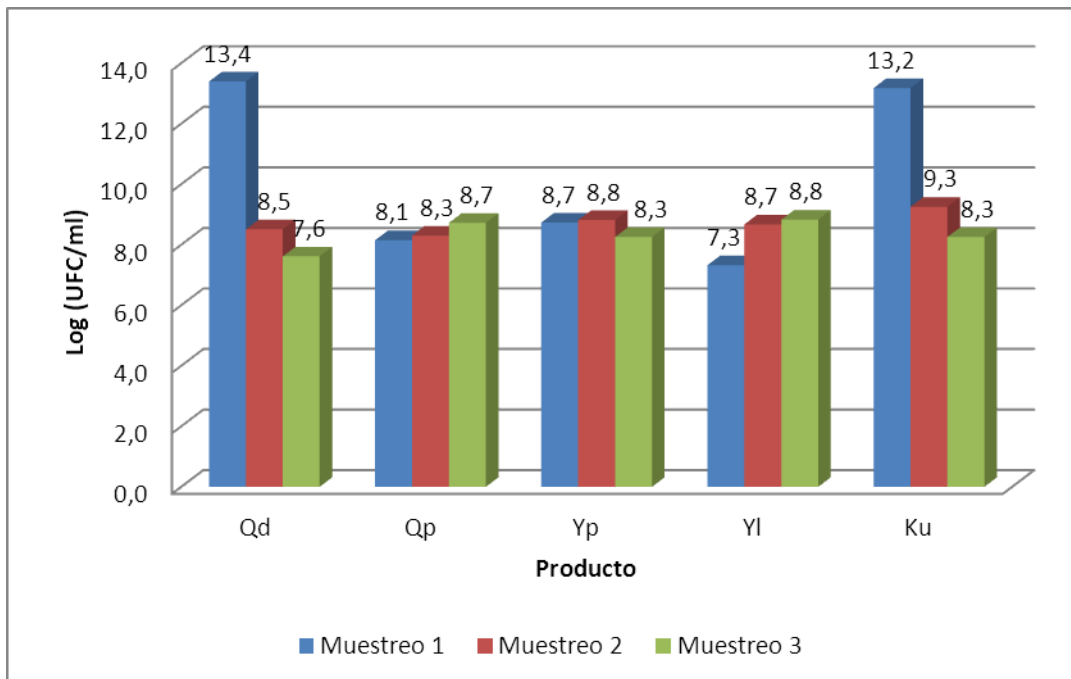


Figura 1. Representación gráfica de las poblaciones bacterianas en los productos.

Luego de realizar las siembras en agar MRS de los productos se encontró la presencia de dos tipos diferentes de microorganismos, el primer tipo correspondió a bacilos que presentaron diferentes morfologías que se evidenciaron por tinción de Gram y observación microscópica y se clasificaron como: KuB, QdA, QdB, QpB, YIB y Yp. aunque todos comparten la forma bacilar, algunos presentaban cuerpos alargados mientras que otros presentaron cuerpos mas cortos, las colonias en general resultaron ser similares, viéndose pequeñas colonias de color blanco grisáceo a excepción de la cepa Qd cuyas colonias tenían una forma grande y blanca mucho mas cremosa. El segundo tipo de microorganismo aislado correspondió a levaduras, estas levaduras presentes en los productos resultaron ser muy similares al realizar la tinción de Gram, todas mostraban tamaños y formas similares, las colonias encontradas eran grandes y cremosas, características de este tipo de microorganismo y se clasificaron así: KuA, QpA y YIA. En las tabla 2 se muestran las características macro y microscópicas de las poblaciones bacterianas encontradas.

Las morfologías bacterianas encontradas coinciden con las referencias bibliográficas consultadas, donde las cepas de BAL y *Lactobacillus s.p* presentan una tinción Gram positiva, no son esporuladas, sin movilidad y con la capacidad de crecer en microaerofilia. Lo cual comprueba que son pertenecientes a las BAL y cabe una gran probabilidad de que pertenezcan al grupo de los *Lactobacillus s.p.* (4,6, 11-13,22)

Los recuentos obtenidos en los aislamientos demuestran que estas cepas pueden ser utilizadas como cultivos iniciadores pues después del periodo de maduración de los productos mantienen una población alta, y no se reporta la producción de metabolitos o sustancias que alteren las propiedades fisicoquímicas de los quesos o los fermentados lácticos por parte de los géneros de *Lactobacillus s.p*, según se reporta los recuentos apropiados deben encontrarse entre 10^6 UFC/mL y 10^8 UFC/mL (6): Los recuentos altos son ideales para la formulación de productos que contengan probióticos ya que se espera que cuando los microorganismos atraviesen la barrera intestinal disminuyan en 1 o 2 ciclos logarítmicos por los efectos adversos que pueden causar en la población las condiciones de pH de tracto gastrointestinal.

Tabla 2. Características macroscópicas y microscópicas de la población bacteriana, según muestreo.

Muestreo	Muestreo 1		Muestreo 2		Muestreo 3	
Características	Macroscópicas	Microscópicas	Macroscópicas	Microscópicas	Macroscópicas	Microscópicas
Queso doble crema	Bacillos gran positivos	Colonias blancas cremosas grandes	Bacillos gran positivos	Colonias blancas cremosas grandes	Bacillos gran positivos	Colonias blancas cremosas grandes
	Bacillos gran positivos cortos	Colonias blancas pequeñas	Bacillos gran positivos cortos	Colonias blancas pequeñas	Bacillos gran positivos cortos	Colonias blancas pequeñas
Queso paipa	Levaduras	Colonias cremosas grandes	Levaduras	Colonias cremosas grandes	Levaduras	Colonias cremosas grandes
	Bacillos gran positivos	Colonias pequeñas blancas	Bacillos gran positivos	Colonias pequeñas blancas	Bacillos gran positivos	Colonias pequeñas blancas
Yogurt "peslac"	Bacillos gran positivos pequeños	Colonias pequeñas	Bacillos gran positivos pequeños	Colonias pequeñas blancas	Bacillos gran positivos pequeños	Colonias pequeñas
Yogurt "la cabaña"	Levaduras	Colonias cremosas grandes	Levaduras	Colonias cremosas grandes	Levaduras	Colonias cremosas grandes
	Bacillos gran positivos pequeños	Colonias pequeñas blancas	Bacillos gran positivos pequeños	Colonias pequeñas	Bacillos gran positivos pequeños	Colonias pequeñas blancas
Kumis	Levaduras	Colonias blancas cremosas grandes	Levaduras	Colonias blancas cremosas grandes	Levaduras	Colonias blancas cremosas grandes
	Bacillos gran positivos	Colonias blancas pequeñas	Bacillos gran positivos	Colonias blancas pequeñas	Bacillos gran positivos	Colonias blancas pequeñas

Pruebas bioquímicas:

Las cepas de bacilos aisladas de los productos fueron identificadas por el uso de pruebas bioquímicas que son presentadas en las siguientes tablas donde se muestran los resultados obtenidos a partir de las pruebas de fermentación de azúcares (threolosa, melódica, rhamnosa y lactosa), de las pruebas de catalasa y oxidasa. Las cepas de levaduras obtenidas de los aislamientos solo se identificaron de forma macroscópica y microscópica gracias a su morfología típica en la tinción Gram y en los medios de cultivo.

Los resultados obtenidos de estas pruebas ubican a las cepas aisladas dentro del género *Lactobacillus s.p*, según lo reportado por el manual Bergey y los artículos consultados, estas cepas se caracterizan por presentar reacciones negativas a las pruebas de catalasa y oxidasa, lo cual las ubica dentro de este género microbiano (11-13,18,19,23). Se procedió a la identificación según la fermentación de los azúcares lo cual da una visión más aproximada de los géneros de *Lactobacillus sp* que se encuentran en los productos lácteos evaluados.

Tabla 3: presentación de los resultados de pruebas de oxidasa y catalasa con las cepas de bacilos Gram positivos aislados de cada una de las muestras.

Bacillo	Prueba de oxidasa	Prueba de catalasa
Qda	Negativa	Negativa
Qdb	Negativa	Negativa
Qpb	Negativa	Negativa
Ylb	Negativa	Negativa
Yp	Negativa	Negativa
Kub	Negativa	Negativa

Lactobacillus s.p es la cepa con capacidad probiótica mas estudiada y reportada, entre las razones podemos encontrar: su gran variedad de especies que llegan a ser más de 140, su variedad genética, dado que el porcentaje molecular de G y C varía entre un 32% y un 54%, además de la producción de un grupo importante de antibióticos naturales o bacteriocinas como lactacin B, lactasin F, Brevicin 37, Buchnericin LB, Lacticin A, Helveticin J, Sakacin A, Plantaricin A, Gassericin A, q son ampliamente utilizadas en la industria alimenticia como preservantes(4) Los resultados obtenidos de la tolerancia de las cepas de bacilos aisladas a diferentes concentraciones de NaCl (3.5, 4.5 y 5.5 %(p/v)) se pueden observar en la tabla 4, donde se presentan los promedios de las pruebas realizadas por triplicado, en el anexo 5 se presentan los resultados completos de esta prueba.

Tabla 4: promedio de los resultados del método ecométrico usado para evaluar la tolerancia a concentraciones diferentes de NaCl

Bacillus	ICA en agar MRS suplementado con 3,5% (p/v) Na Cl	ICA en agar MRS suplementado con 4,5% (p/v) Na Cl	ICA en agar MRS suplementado con 5,5% (p/v) Na Cl	ICA en agar sin suplementar con NaCl
Ku B	0	0	0	1,4
Qd A	1,2	0	0	4,5
Qd B	0	0	0	2
QpB	0,3	0	0	1,7
YIB	0	0	0	5
Yp	0	0	0	3,2

En la Figura 2 y Tabla 4 se encuentran los resultados del método ecométrico para evaluar la tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl. Los bacilos Qdb, Yl, Yp, y Ku mostraron cero tolerancia a NaCl en todas las concentraciones, mientras que los bacilos Qda y Qp mostraron un ICA de 1,2 y 0,3 respectivamente a una concentración de 3,5 NaCl, para las demás concentraciones el valor fue cero. Según lo informado en el manual bergye el genero *lactobacillus s.p* no crece en concentraciones mayores al 3% de NaCl, sin embargo por su gran diversidad taxonómica se encuentran algunos géneros que toleran estas concentraciones (23-24), ejemplos de este caso son los géneros *L. gallinarum*, *L. gasseri* y *L. johnsonii* que toleran concentraciones mayores a 3.0%, estos géneros son comunes en el sistema gastrointestinal del hombre y animales (25).

sin embargo se esperaba que el crecimiento de los controles tuviera un ICA cercano a 5, pues este medio no se suplemento con cloruro de sodio por lo cual se esperaba que las bacterias crecieran en todas las estrías, sin embargo este crecimiento solo se logro en las cepas Qda, YIB y Yp. Mientras que las demás cepas tuvieron un desarrollo escaso, esto puede deberse a las condiciones de la técnica, pues se realizan estrías donde se va agotando la carga microbiana en cada cuadrante, la técnica no se invalida, pues si hubo crecimiento en los controles, y el objetivo era evaluar si las cepas aisladas presentaban una tolerancia a las diferentes concentraciones de NaCl.

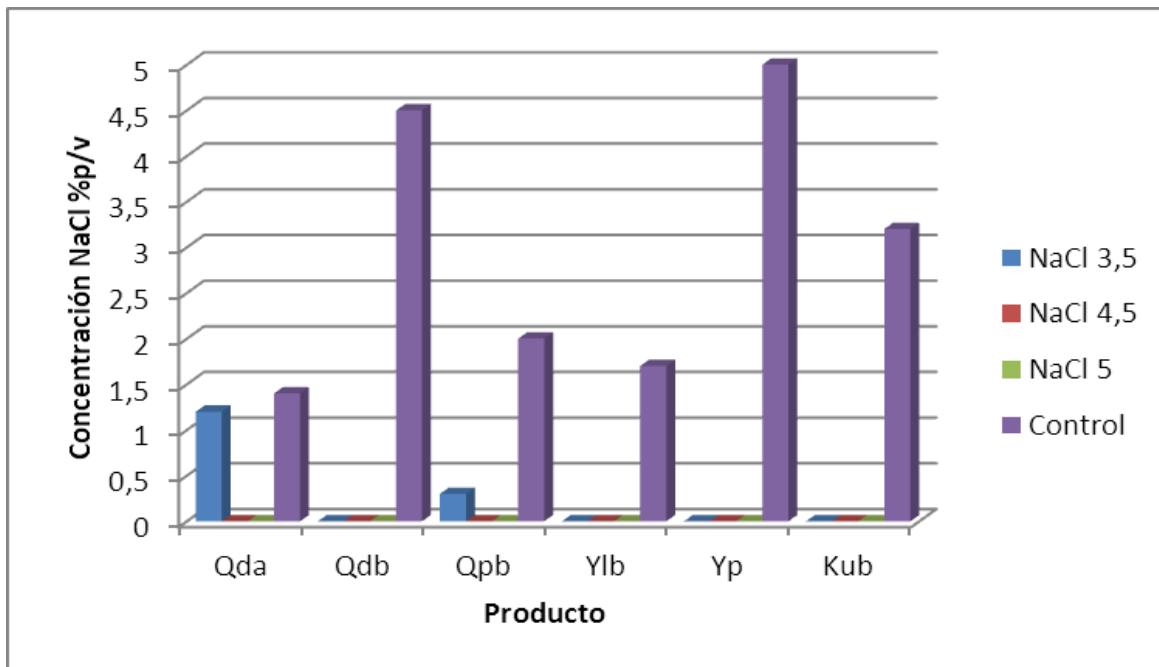


Figura 2. Distribución de la tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl de las cepas aisladas.

En la Tabla 5 se encuentran las pruebas de azúcares, los resultados muestran que los bacilos Ylb, Yp y Kub fermentan todos los tipos de azúcar, puesto que en todas las pruebas el resultado fue positivo. El bacilo Qda, también fermenta todos los azúcares; no obstante, en la prueba de la Trealosa el primer muestreo dio negativa. Los bacilos Qdb y Qpb no fermentan azúcar alguno, encontrándose todas las pruebas negativas excepto para el primer muestreo del bacilo Qdb.

Tabla 5: fermentación de azúcares por parte de las cepas aisladas.

	Prueba para la fermentación de azúcares			
	Trealosa	Melobiosa	Rhamnosa	Lactosa
KuA	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
QdA	-	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
QdB	+	-	-	-
	-	-	-	+
	-	-	-	+
QpB	-	-	-	-
	-	-	-	+
	-	-	-	+
YIB	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
Yp	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+

En esta prueba se evalúa la capacidad de fermentar estos azúcares por parte de las Bacterias aisladas con el fin de realizar una identificación de los géneros encontrados en los productos, para esto se usó la técnica de micro placa reportada por Pedroza *et al*, en la que la fermentación de los azúcares se evidencia por el viraje de color del indicador rojo de fenol, que en condiciones ácidas vira de un color rojo-naranja a uno amarillo, revelando la presencia de ácidos orgánicos producidos por los microorganismos y así mismo la fermentación de los azúcares con la consecuente producción de estos ácidos, lo que se consideró un resultado positivo, siendo así una coloración roja negativa.(11-13)

Los resultados de la fermentación de azúcares coinciden con los posibles resultados de diferentes cepas de *Lactobacillus s.p* según se informa en la bibliografía y según el manual de Bergey, la cepa de bacilos Kub, QdB, YP y YLB podrían ser representantes del género *Lactobacillus salivarius* o *Lactobacillus plantarum*. Las cepa QdB y QpB pueden ser representantes de los género *Lactobacillus delbrueckii* sub especie *bulgaricus* o de *Lactobacillus acidophilus* (22,26). Es muy importante destacar en este punto que dada la complejidad de la especie *Lactobacillus s.p*, es de vital importancia para su identificación el uso de técnicas moleculares, ya que la especie posee características fenotípicas y fisiológicas muy similares, además de una transferencia horizontal de plásmidos que dificulta su diferenciación por métodos bioquímicos, una de las técnicas más reportadas para su identificación es 16s RNA, aunque se pueden usar otras como el análisis de macro restricción enzimática, Ribotyping, metodologías basadas en PCR, AFLP, ARDRA y MLST (4), el uso de estas técnicas permitiría una identificación más

especifica de los géneros encontrados pues muchos géneros comparten características metabólicas similares.

Antagonismo: Ensayo de Ritter

Las pruebas de antagonismo realizadas a través del ensayo de Ritter permitieron evaluar la capacidad de las cepas de *Lactobacillus s.p* aisladas para presentar un efecto antagónico por la posible producción de bacteriocinas o competencia, los resultados son presentados en las Tablas 6-11, por medio del uso de una ANOVA de una vía comparando los halos de inhibición de crecimiento producidos por los *Lactobacillus s.p* aislados sobre las 4 cepas de microorganismos patógenos o alteradores de productos lácteos contra el control., si el valor p es > a 0,05 nos indica que los mm de inhibición no son estadísticamente diferentes, por el contrario si el valor de p es < de 0,05 la diferencia en mm de inhibición es estadísticamente diferente. Los datos por triplicado se presentan en el anexo 6. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre los seis bacilos de los productos lácteos y el grupo control; lo cual sugiere que los bacilos no presentaron una actividad bacteriosida.

Tabla 6. Comparación de los halos de inhibición de crecimiento (mm) producido con el bacilo Qda y el control.

Bacteria	Qda $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	0,66±1,15	14,3±0,58	-13,7 (-15,1;12,2)	0,0006
<i>Salmonella</i>	0,00±0,0	14,3±1,53	-14,3 (-18,1;-10,5)	0,0038
<i>Penicilyum</i>	0,00±0,0	14,3±0,58	-14,3 (-15,8;-12,9)	0,0005
<i>Aspergillus</i>	0,00±0,0	14,0±0,00	-14,0 (-14,0; -14,0)	-

- No se pudo calcular. \bar{x} : Promedio DE: Desviación Estándar

Tabla 7. Comparación de los halos de inhibición de crecimiento (mm) producido con el bacilo Qdb y el control.

Bacteria	Qdb $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	0±0	14,3±0,58	-14,3 (-15,8;-12,9)	0,0005
<i>Salmonella</i>	0±0	14,3±1,53	-14,3 (-18,1;-10,5)	0,0038
<i>Penicilyum</i>	0±0	14,3±0,58	-14,3 (-15,8;-12,9)	0,0005
<i>Aspergillus</i>	0±0	14,0±0,00	-14,0 (-14,0;-14,0)	-

- No se pudo calcular.

Tabla 8. Comparación de los halos de inhibición de crecimiento (mm) producido con el bacilo Qpb y el control.

Bacteria	Qpb $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	0±0,0	14,3±0,58	-14,3 (-15,8;-12,8)	0,0005
<i>Salmonella</i>	1±1,7	14,3±0,15	-13,3 (-20,9;-5,7)	0,0171
<i>Penicilyum</i>	0±0,0	14,3±0,85	-14,3 (-15,8;-12,9)	0,0005
<i>Aspergillus</i>	0±0,0	14,0±0,00	-14,0 (-14,0; -14,0)	-

- No se pudo calcular. \bar{x} : Promedio DE: Desviación Estándar

Tabla 9. Comparación de los halos de inhibición de crecimiento (mm) producido con el bacilo Ylb y el control.

Bacteria	Ylb $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	0,0±0,00	14,3±0,58	-14,3(-15,8;-12,8)	0,0005
<i>Salmonella</i>	0,6±1,15	14,3±1,52	-13,7 (-19,9;-7,12)	0,0111
<i>Penicilyum</i>	0,0±0,00	14,3±0,58	-14,3 (-15,8;-12,8)	0,0005
<i>Aspergillus</i>	0,0±0,00	14,0±0,00	-14,0 (-14,0; -14,0)	-

- No se pudo calcular. \bar{x} : Promedio DE: Desviación Estándar

Tabla 10. Comparación de los halos de inhibición de crecimiento (mm) producido con el bacilo Yp y el control.

Bacteria	Yp $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	0±0,00	14,3±0,58	-14,3 (-15,8;-12,8)	0,0005
<i>Salmonella</i>	1±1,73	14,3±1,53	-13,3 (-20,9;-5,7)	0,0171
<i>Penicilyum</i>	0±0,00	14,3±0,58	-14,3 (-15,8;-12,8)	0,0005
<i>Aspergillus</i>	0±0,00	14,0±0,00	-14,0 (-14,0; -14,0)	-

- No se pudo calcular.

Tabla 11. Comparación de los halos de inhibición de crecimiento (mm) producido con el bacilo Kub y el control.

Bacteria	Kub $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	1±1,7	14,3±0,58	-13,3 (-16,2;10,5)	0,0025
<i>Salmonella</i>	0±0,0	14,3±1,52	-14,3 (-18,1;-10,5)	0,0038
<i>Penicilyum</i>	0±0,0	14,3±0,58	-14,3 (-15,8;-12,9)	0,0005
<i>Aspergillus</i>	0±0,0	14,0±0,00	-14,0 (-14,0;-14,0)	-

- No se pudo calcular. \bar{x} : Promedio DE: Desviación Estándar

En las Tablas 12-14 se presentan los promedios en mm de halos de inhibición de cada patógeno para la levadura de estudio y el grupo control. Los resultados muestran que hubo diferencias estadísticamente significativas entre el promedio en mm de halos de inhibición de todas las bacterias para cada levadura estudiada (Qpa, Yla y Kua) comparado con el control, por lo cual no hubo una acción antagónica.

Tabla 12. Comparación de los halos de inhibición de crecimiento (mm) producido con la levadura Qpa y el control.

Bacteria	Qpa $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	2,3±1,2	14,3±0,57	-12,0 (-16,9;-7,03)	0,0091
<i>Salmonella</i>	0±0,0	14,3±0,57	-14,3 (-15,7;-12,9)	0,0005
<i>Penicilyum</i>	0±0,0	13,6±0,58	-13,6 (-15,2;-12,23)	0,0006
<i>Aspergillus</i>	0±0,0	14,3±0,00	-14,3 (-15,8; -12,9)	0,0005

\bar{x} : Promedio DE: Desviación Estándar

Tabla 13. Comparación de los halos de inhibición de crecimiento (mm) producido con la levadura Yla y el control.

Bacteria	Yla $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	1,3±1,2	14,3±0,57	-15,5 (-15,5;-10,5)	0,0020
<i>Salmonella</i>	0±0,0	14,3±0,57	-14,3 (-15,7;-12,9)	0,0005
<i>Penicilyum</i>	0±0,0	13,6±0,58	-13,6 (-15,2;-12,23)	0,0006
<i>Aspergillus</i>	0±0,0	14,3±0,00	-14,3 (-15,8; -12,9)	0,0005

\bar{x} : Promedio DE: Desviación Estándar

Tabla 14. Comparación de los halos de inhibición de crecimiento (mm) producido con la levadura Kua y el control.

Bacteria	Kua $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	1,6±1,5	14,3±0,57	-12,6(-16,5;-8,87)	0,0048
<i>Salmonella</i>	0±0,0	14,3±0,57	-14,3 (-15,7;-12,9)	0,0005
<i>Penicilyum</i>	0±0,0	13,6±0,58	-13,6 (-15,2;-12,23)	0,0006
<i>Aspergillus</i>	0±0,0	14,3±0,00	-14,3 (-15,8; -12,9)	0,0005

\bar{x} : Promedio DE: Desviación Estándar

Las BAL son conocidas por su capacidad como microorganismos probióticos, que pueden inhibir el crecimiento bacteriano por la formación de ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, diacetilo, antibióticos y bacteriocinas, una gran cantidad de las BAL mas reconocidas pertenecen a los *Lactobacilus s.p.*(6,14) y muchos estudios se han enfocado en la evaluación de su actividad antagónica contra una gran variedad de microorganismos, se ha evaluado su capacidad de producir bacteriocinas y otros productos de su metabolismo que inhiben el desarrollo microbiano. Los resultados presentados en la tabla 7 muestran claramente que las cepas aisladas no tuvieron una acción inhibitoria contra *E. coli*, *Salmonella tipheri*, *Aspergillus niger* o *Penicillium s.p.*

Con la siembra de los discos impregnados con la solución en la que se encontraban suspendidas las cepas aisladas se buscaba evidenciar el antagonismo generado por sustancias extracelulares por competencia o producción de ácidos orgánicos, los resultados negativos se pueden deber a que las condiciones de la prueba no fueron las optimas para que las cepas produjeran las sustancias inhibidoras, pues es reportado en la bibliografía que las cepas de BAL requieren para su optimo desarrollo complejas necesidades de factores de crecimiento; vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases puricas y pirimidicas (14, 21). En ausencia el crecimiento y desarrollo de las BAL no es adecuado, y se puede dar la ausencia de ácidos orgánicos u otros componentes inhibidores de crecimiento por lo cual se recomienda su aislamiento y evaluación en medios como: MRS o Agar Rogosa, es por esto que al sembrar los discos de papel en el medio nutritivo no se evidencio una acción antagónica contra los patógenos y hongos evaluados, además no hay muchos reportes de actividad antifúngica producida por BAL (27), otro factor importante a tener en cuenta es que en el manejo de esta metodología resulta difícil satisfacer las condiciones de crecimiento tanto de los microorganismos patógenos como

de los probióticos, pues para su desarrollo requieren de factores ambientales diferentes, tales como temperatura, fuentes nutricionales o concentración de O₂. De esta manera durante este proceso se pudo dar ventaja a los microorganismos patógenos sobre los probióticos, siendo esta una posible razón de los resultados negativos.

Con respecto a la inhibición que generaron las levaduras contra *E.coli*, es apropiado señalar que se debe a una competencia por nutrientes, ya que este tipo de microorganismos no son productores de enzimas u metabolitos antibacterianos o fúngicos y la su actividad probiótica radica en diferentes factores como: el aumento de vitamina B, excreción de promotores de crecimiento, acción estimulante de de la inmunidad, mejoran la asimilación de nutrientes y se ha reportado que géneros como *S. cerevisiae* var. *Boulardii* pueden producir una estimulación de la secreción de inmunoglobulinas intestinales y una reducción en la producción o secreción de diferentes toxinas bacterianas.(28).

Evaluación de la producción de metabolitos extracelulares

Los siguientes resultados son producto del extracto obtenido después de centrifugar las cepas de *Lactobacillus s.p* contra las dos bacterias patógenas en las Tablas 15-20 se presenta la evaluación de la producción de metabolitos extracelulares. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diámetros promedio de halos de inhibición de cada cepa evaluada comparada con el control, así que no hubo producción de bacteriocinas por parte de los bacilos aislados.

Tabla 15. Comparación los diámetros promedio (mm) de los halos de inhibición obtenidos con los extractos de Qda sobre las bacterias patógenas y el control.

Bacteria	Qda $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	0,0±0,0	14,3±0,58	-14,3 (-15,8;-12,9)	0,0005
<i>Salmonella</i>	0,0±0,0	14,3±1,52	-14,3 (-18,1;-10,5)	0,0038

Tabla 16. Comparación los diámetros promedio (mm) de los halos de inhibición obtenidos con los extractos de Qdb sobre las bacterias patógenas y el control.

Bacteria	Qdb $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	0,0±0,0	14,3±0,58	-14,3 (-15,8;-12,9)	0,0005
<i>Salmonella</i>	0,0±0,0	14,3±1,52	-14,3 (-18,1;-10,5)	0,0038

Tabla 17. Comparación los diámetros promedio (mm) de los halos de inhibición obtenidos con los extractos de Ypb sobre las bacterias patógenas y el control.

Bacteria	Ypb $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	0,0±0,0	14,3±0,58	-14,3 (-15,8;-12,9)	0,0005
<i>Salmonella</i>	0,0±0,0	14,3±1,52	-14,3 (-18,1;-10,5)	0,0038

Tabla 18. Comparación los diámetros promedio (mm) de los halos de inhibición obtenidos con los extractos de Ylb sobre las bacterias patógenas y el control.

Bacteria	Ylb $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	0,0±0,0	14,3±0,58	-14,3 (-15,8;-12,9)	0,0005
<i>Salmonella</i>	0,0±0,0	14,3±1,52	-14,3 (-18,1;-10,5)	0,0038

Tabla 19. Comparación los diámetros promedio (mm) de los halos de inhibición obtenidos con los extractos de Yp sobre las bacterias patógenas y el control.

Bacteria	Yp $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	0,0±0,0	14,3±0,58	-14,3 (-15,8;-12,9)	0,0005
<i>Salmonella</i>	0,0±0,0	14,3±1,52	-14,3 (-18,1;-10,5)	0,0038

Tabla 20. Comparación los diámetros promedio (mm) de los halos de inhibición obtenidos con los extractos de Kua sobre las bacterias patógenas y el control.

Bacteria	Kua $\bar{x} \pm DE$	Control $\bar{x} \pm DE$	Diferencia \bar{x} (IC95%)	Valor p
<i>E coli</i>	0,0±0,0	14,3±0,58	-14,3 (-15,8;-12,9)	0,0005
<i>Salmonella</i>	0,0±0,0	14,3±1,52	-14,3 (-18,1;-10,5)	0,0038

Se ha informado que la producción de las bacteriocinas no es directamente proporcional al crecimiento microbiano o al aumento de masa de las bacterias, la producción de estas sustancias extracelulares se da en concentraciones bajas de nutrientes que estimulan el crecimiento o bajo condiciones de temperatura y pH mas bajas que las requeridas para un crecimiento optimo, la producción optima de bacteriocinas es detectada en medios que tienen una concentración limitante de azucars, fuentes de nitrógenos, vitaminas y fosfatos de potasio o bajo condiciones reguladas de pH según lo informado por Svetoslav D. *et al* en su estudio de la bacteriocinas R1333 producida por *L. sakei* R1333 (7), los resultados de este experimento fueron negativos, ninguno de los extractos de las cepas produjo un efecto inhibitorio, y una de las posibles explicaciones es que las condiciones nombradas anteriormente no se mantuvieron en este proceso. Además es bien sabido que las bacteriocinas poseen un espectro de acción muy específico y la mayoría de bacteriocinas reportadas actúan sobre las bacterias Gram positivas aunque algunas tienen una acción sobre bacterias Gram negativas, como es el caso de *L. acidophilus* que bajo condiciones controladas produce bacteriocinas que inhiben el crecimiento de *C. sporogenes* (6,14). En la bibliografía consultada se usan metodologías similares controlando los factores ambientales y químicos como el tiempo de incubación, temperatura, pH. Además se realizan purificaciones de las bacteriocinas antes de realizar los ensayos de antagonismo con métodos de precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ y filtrado con Sephadex G25, se reporta también el uso de técnicas como: el método Agar-spot-test y triple- agar-layer method.

Conclusiones:

- Los productos lácteos de preparación artesanal evaluados presentaron altos recuentos de BAL ($10E^6$ - $10E^8$) que pueden ser usadas como cultivos iniciadores para los procesos de producción de futuros suplementos alimenticios con probióticos.
- La identificación bioquímica de las cepas aisladas resulta no ser suficiente para obtener una ubicación de los géneros completamente confiable, y se hace evidente la necesidad de pruebas moleculares que confirmen las especies aisladas.
- Las cepas de *Lactobacillus s.p* aisladas no presentaron una actividad antagónica que se pueda evidenciar por medio de los procesos empleados, sin embargo no es una prueba que confirme la ausencia de estas sustancias.
- Las levaduras aisladas presentaron un bajo poder inhibitorio contra *E. coli*, sin embargo sería importante su posterior evaluación e identificación, para poder evaluar si posible poder como probióticos o como cultivos iniciadores.

Recomendaciones:

- Se recomienda la aplicación de una metodología basada en la identificación 16s RNA, para identificar específicamente las especies de las cepas encontradas.
- Se recomienda el uso de una metodología diferente bajo condiciones ambientales, físicas y químicas más controladas para la producción de bacteriocinas.
- Se recomienda que el método de prueba de antagonismo se realice en dos medios que permitan el buen desarrollo de las cepas enfrentadas como BHI y MRS, para así comparar los resultados obtenidos en cada medio.

Bibliografía:

1. Yousef I, Lloyd B. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *International Journal of Food Microbiology*. 2008; **121**, 112–115.
2. Atanassova M, Choiset Y, Dalgalarondo M, Chobert JM, Dousset X, Ivanova I, Haertle T. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; **87**, 63– 73.
3. Pennacchia C, Ercolini D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science*. 2004; **67**, 309–317.
4. Smita S, Pawas G, Rameshwar S, Knut J. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT - Food Science and Technology*. 2009; **42**, 448–457.
5. Ortiz A, Reuto J. Evaluación de la capacidad probiótica “in vitro” de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. **Tesis**. Facultad de ciencias. Pontificia universidad javeriana, bogota, 2007, 107 p.
6. Cástulo I. Del Campo M, Gómez H, Alaníz R. Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *e-Gnosis Universidad de Guadalajara*. 2008; **6**, 1-17.
7. Svetoslav D, Todorov , Cinta R, Ange´ lique F, Leon M.T, Carol V, Herve Pre´vost, Xavier D. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe xxx*. 2010; 1–9.
8. Francisco B, Marie Antonette R, , Rommel A, Helen A. Mendoza, Marcelina B. Lirazan. Spectrum of bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprinting by RAPD-PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; **95**, 11 – 18.
9. Ana E, Luz G, Olga M. evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. Y *Escherichia coli*. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*. 2005; **58**,p. 2601-2609.
10. Gutiérrez L, Gómez A, Arias L, Tangerife B. Evaluación de la viabilidad de una cepa probiotica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema. *Revista lasallista de investigación*. 2007; **4** (002), 37-42.
11. Gómez S, Guzmán D. Efecto antagónico de BAL autóctonas del Huila sobre *Salmonella enteritidis* aviar. **Tesis**. Facultad de ciencias. Tesis. Facultad de ciencias. Pontificia universidad javeriana, bogota, 1999. 123 p.
12. Aguádelo D, Díaz M. Efecto antagónico de BAL aerobias y capnofílicas encontradas en leche y productos lácteos artesanales de 6 ciudades de Boyacá frente a *Salmonella enteritidis* aviar. **Tesis**. Facultad de ciencias. Pontificia universidad javeriana, bogota, 1996, 228 p.
13. Rodríguez M, Silvera M. Efecto antagónico de bacterias ácido lácticas aisladas de Cundinamarca a partir de productos artesanales frente a *Salmonella enteritidis* aviar. **Tesis**. Facultad de ciencias. Pontificia universidad javeriana, bogota, 1997, 192 p.
14. Cabeza E. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica1. *universidad de Pamplona*. 2005
15. Vasek O, Martínez M, Cardozo M. Antagonismo de bacterias lácticas de Corrientes y patógenos aislados de lechuga fresca. Efecto de *Lactobacillus plantarum* 59b y

93b VCOR. *Comunicaciones científicas y tecnológicas*. universidad nacional del noreste. 2008; **6**, 1-8.

16. Collado M, Hernández M. Identification and differentiation of *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* species in fermented milk products with bifidobacteria. *Microbiological Research*. 2007; **162**, 86-92.
17. D'Aimmo M, Modesto M, Biavati B. Antibiotic resistance of Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacterium spp.* isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*. 2007; **115**, 35–42.
18. Suarez J. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá). **Tesis**. Universidad de la salle, Bogota, 2008, 84 p.
19. Villamil L, Figueras A, Planas M, Novoa B. Control of *Vibrio alginolyticus* in Artemia culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*. 2003; **219**, 43–56.
20. Pedroza A. Producción de α -amilasa por cepas nativas de *Thermus s.p.* por fermentación Discontinua. **Tesis**. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Maestría en Microbiología, bogota, 2000, 119 p.
21. Lord E. Utilización de *Lactobacillus acidophilus* como agente antagónico para el control de *Salmonella enteritidis* en pescado. **Tesis especialidad**. Escuela de biología. Instituto tecnológico de costa rica. Cartago, 2002, 63 p.
22. Zamora L. aislamiento, concervacion e identificación de cultivo de bacterias lacticas antagonistas de microbiota contaminantede sabgrede matadero. **tesis doctoral**. Universidad de girona, 2003, 259p.
23. Bergey H, John G. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Novena edicion, Williams and wikins, USA, Baltimore, 1994, 787 pag.
24. klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G. taxonomy and physiology of probiotic lactic bacteria. *International journal of food microbiology*. 41, 103-125 p.
25. Martin J, Todd R. Genetic Modification of Intestinal Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2000; **2**(2), 41-50.
26. Heng y, Wan-hong t, Cui-xiang w, Li-jun j, Jan-yin w, Jing y, Chun-mei l, Ming z, hua w. Antagonistic Potential against Pathogenic Microorganisms and Hydrogen Peroxide Production of Indigenous Lactobacilli Isolated from Vagina of Chinese Pregnant Women. *biomedical and environmental sciences*. 2008; **21**, 365-371.
27. Yang E., Chang H. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology* 2010; **139** , 56–63.
28. Ortiz Á, Reuto J, Fajardo E, Sarmiento S, Aguirre A, Arbeláez G, Gómez D, Quevedo B. evaluación de la capacidad probiótica “in vitro” de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. *UNIVERSITAS SCIENTIARUM*. 2008; **13** (2), 138-148.

ANEXOS

Anexo 1: Agar MRS

Componente	g/L
Proteosa peptona No. 3	10,0
Extracto de carne	10,0
Extracto de levadura	5,0
Dextrosa	20,0
Polisorbato 80	1,0
Citrato de amonio	2,0
Acetato de sodio	5,0
Sulfato de magnesio	0,1
Sulfato de manganeso	0,1
Fosfato de potasio dibasico	2,0
Agar	15,0

Anexo 2: Agar Nutritivo

Componente	g/L
Pluripeptona	5.0
Extracto de carne	3.0
Cloruro de sodio	8.0
Agar	15.0

Anexo 3: Agar PDA

Componente	g/L
Extracto de papa	4,0
Glucosa	20,0
Agar	15,0

Anexo 4: Agar MUELLER HINTON

Componente	g/L
Extracto de carne	2.0
Caseina acida hidrolisada	17.5
Almidon	1.5
Agar	17

Anexo 5: Resultados del método ecométrico y promedios usados para evaluar la tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl en % ICA.

Bacilo	Muestreo	Concentración NaCl			Control
		3.5	4.5	5.0	
Qda	Uno	1,4	0,0	0,0	5,0
	Dos	1,0	0,0	0,0	3,4
	Tres	1,2	0,0	0,0	5,0
	Promedio	1,2	0,0	0,0	4,5
Qdb	Uno	0,0	0,0	0,0	2,0
	Dos	0,0	0,0	0,0	2,2
	Tres	0,0	0,0	0,0	2,0
	Promedio	0,0	0,0	0,0	2,1
Qpb	Uno	0,4	0,0	0,0	1,6
	Dos	0,4	0,0	0,0	1,6
	Tres	0,0	0,0	0,0	2,0
	Promedio	0,3	0,0	0,0	1,7
Ylb	Uno	0,0	0,0	0,0	5,0
	Dos	0,0	0,0	0,0	5,0
	Tres	0,0	0,0	0,0	5,0
	Promedio	0,0	0,0	0,0	5,0
Yp	Uno	0,0	0,0	0,0	3,4
	Dos	0,0	0,0	0,0	3,0
	Tres	0,0	0,0	0,0	3,2
	Promedio	0,0	0,0	0,0	3,2
Kub	Uno	0,0	0,0	0,0	1,4
	Dos	0,0	0,0	0,0	1,0
	Tres	0,0	0,0	0,0	1,8
	Promedio	0,0	0,0	0,0	1,4

Anexo 6: Tablas de resultados de los halos de antagonismo.

	Halos de inhibición (mm)						
	Extracto de las cepas						
	KUb	QDa	QDb	QPb	YLb	YP	control
E coli	0	0	0	0	0	0	14
	0	0	0	0	0	0	15
	0	0	0	0	0	0	14
Salmonella	0	0	0	0	0	0	13
	0	0	0	0	0	0	14
	0	0	0	0	0	0	16

Anexo 6.1: resultados de inhibición por extracto de cepas evaluadas

Halos de inhibición (mm)							
Cepas de bacillos aisladas							
	KUb	QDa	QDb	QPb	YLb	YP	control
E coli	0	0	0	0	0	0	14
	3	2	0	0	0	0	15
	0	0	0	0	0	0	14
Salmonella	0	0	0	3	2	3	13
	0	0	0	0	0	0	14
	0	0	0	0	0	0	16
penicilyum	0	0	0	0	0	0	14
	0	0	0	0	0	0	14
	0	0	0	0	0	0	15
aspergillus	0	0	0	0	0	0	14
	0	0	0	0	0	0	14
	0	0	0	0	0	0	14

Anexo 6.2: resultados de inhibición por enfrentamiento directo con las cepas de bacillos evaluadas

Halos de inhibición (mm)				
Cepas de levaduras aisladas				
	KUa	QPA	YLA	Control
E coli	3	4	2	14
	2	3	2	15
	0	0	0	14
Salmonella	0	0	0	14
	0	0	0	15
	0	0	0	14
Penicilyum	0	0	0	14
	0	0	0	13
	0	0	0	14
Pspergillus	0	0	0	14
	0	0	0	15
	0	0	0	14

Anexo 6.3: resultados de inhibición por enfrentamiento directo con las cepas de levadura evaluadas.