

CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AUTÓCTONAS AISLADAS DE QUESO DOBLE CREMA Y QUESILLO COLOMBIANO

ANTIMICROBIAL CAPACITY OF NATIVE LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM DOUBLE CREAM CHEESE AND COLOMBIAN QUESILLO

CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS NATIVAS ÁCIDO LÁCTICO ISOLADA DE QUEIJO DUPLO CREME E QUESILLO COLOMBIANO

MAYRA-FUENTES FANEGAS¹, ANDRÉS-LONDOÑO ZAPATA², MÓNICA-DURANGO ZULETA³,
MARGARITA-GUTIÉRREZ BURITICÁ⁴, SUSANA-OCHOA AGUDELO⁵, JOSÉ-SEPÚLVEDA VALENCIA⁶

RESUMEN

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) autóctonas han sido reportadas como una alternativa eficiente para la biopreservación natural, la prevención de Enfermedades

Recibido para evaluación: 12 de Junio de 2016. **Aprobado para publicación:** 1 de Noviembre de 2016.

- 1 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Grupo GICTA, Bacterióloga y Laboratorista Clínico. Medellín, Colombia.
- 2 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Grupo MICROBIOP, Microbiólogo Industrial y Ambiental. Medellín, Colombia.
- 3 Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Facultad Ciencias de la Salud, Grupo BIOCIENCIAS, Magíster en Ciencia y Tecnología de los alimentos. Medellín, Colombia.
- 4 Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Facultad Ciencias de la Salud, Grupo BIOCIENCIAS, Magíster en Ciencia y Tecnología de los alimentos. Medellín, Colombia.
- 5 Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Facultad Ciencias de la Salud, Grupo BIOCIENCIAS, Magíster en Ciencias Biotecnología. Medellín, Colombia.
- 6 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Grupo GICTA, Magíster en Ciencia y Tecnología de los alimentos. Medellín, Colombia.

Correspondencia: mafuentesv@unal.edu.co

de Transmisión Alimentaria (ETAS) y el mejoramiento de los procesos de producción de alimentos fermentados tradicionales. El objetivo fue evaluar la capacidad antimicrobiana de BAL autóctonas aisladas de Queso Doble Crema y Quesillo frente al crecimiento *in vitro* de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Se estudiaron 32 aislados, identificados previamente mediante el análisis de secuencias del gen 16S DNAr y caracterizados tecnológicamente. Se comprobó su capacidad antimicrobiana utilizando la técnica de la mancha en agar. Posteriormente, los sobrenadantes libres de células se neutralizaron y filtraron para detectar su actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en gel por perforación en placa. Se seleccionaron 8 aislados que mostraron capacidad inhibidora frente a los dos microorganismos patógenos. El aislado identificado como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Q5 presentó una actividad superior, equivalente a 64.000 UA/mL para *L. monocytogenes* y 4.000 UA/mL para *S. typhimurium*. Se sugiere que las BAL provenientes de quesos tradicionales colombianos producen sustancias antimicrobianas con potencial bactericida y pueden ser utilizadas en la formulación de un cultivo iniciador con efecto bioprotector.

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) native to have been reported as an efficient alternative for natural biopreservation, prevention of Foodborne Diseases (ETAS) and improvement production processes of traditional fermented foods. The objective was to evaluate the antimicrobial capacity of native BAL isolated from Double Cream Cheese and Quesillo against the in vitro growth of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC 13311 and Listeria monocytogenes ATCC 7644. We studied 32 isolates, previously identified by analysis of 16S rDNA gene sequences and characterized technologically. We tested antimicrobial capacity using an agar spot test. Subsequently, cell-free supernatants were neutralized and filtered to detect their antimicrobial activity using the gel diffusion method by drilling plate. We selected 8 isolates showing inhibitory capacity against the two pathogens microorganisms. Isolated identified as Lactococcus lactis subsp. lactis Q5 presented higher activity, equivalent to 64.000 AU/ml for L. monocytogenes and 4.000 AU/ml for S. typhimurium. It is suggested that BAL from traditional cheeses produce antimicrobial substances Colombian bactericidal potential and can be used in formulating a starter culture with bioprotective effect.

RESUMO

Bactérias lácticas (LAB) nativas têm sido relatados como uma alternativa eficiente para biopreservação natural, prevenção de Doenças Transmitidas por Alimentos (ETA) e melhoria dos processos de produção de alimentos fermentados tradicionais. O objetivo foi avaliar a capacidade antimicrobiana de BAL nativa isolado do queijo creme de leite e quesillo contra o crescimento in vitro de Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC 13311y Listeria monocytogenes ATCC 7644. Foram estudados 32 isolados, previamente identificadas por análise de sequências de genes 16S rDNA e caracterizada tecnologicamente. Foi verificada o capacidade

PALABRAS CLAVE:

Antimicrobianos, *Listeria monocytogenes*, Preservación, *Salmonella typhimurium*, Quesos colombianos.

KEYWORDS:

Antimicrobials, *Listeria monocytogenes*, Preservation, *Salmonella typhimurium*, Colombian cheese.

PALAVRAS-CHAVE:

Antimicrobiana, *Listeria monocytogenes*, Preservação, *Salmonella typhimurium*, Queijos colombianos.

*antimicrobiana por meio da técnica da mancha em agar. Subsequentemente, os sobrenadantes livres de células foram neutralizadas e filtrou-se para detectar a sua actividade antimicrobiana usando o método de difusão por placa de gel de perfuração. Foram seleccionados isolados 8 que mostram a capacidade inibidora contra os dois agentes patogénicos. Isolado identificado como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Q5 apresentou maior atividade, o equivalente a 64.000 UA/ml para *L. monocytogenes* e 4.000 AU/ml para *S. typhimurium*. Sugere-se que a LAB de queijos tradicionais produzem substâncias antimicrobianas colombiano potencial bactericida e pode ser utilizado na formulação de uma cultura de arranque com efeito bioprotector.*

INTRODUCCIÓN

Las Bacterias Ácido Lácticas son utilizadas en la industria alimentaria como cultivos iniciadores para la obtención de productos fermentados y sus metabolitos se han empleado como bioconservantes naturales por su capacidad para controlar el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorantes de los alimentos. Dentro de estos metabolitos se destacan las bacteriocinas, descritos como péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular, estables a bajo pH, sensibles a la acción de las proteasas y termoestables; propiedades que los convierte en los compuestos ideales para sustituir parcialmente el uso agentes químicos en alimentos [1].

De acuerdo a la legislación colombiana, el proceso de elaboración de los quesos artesanales debe involucrar la pasteurización de la materia prima, proceso térmico que afecta la microbiota autóctona presente, principalmente las BAL, las cuales contribuyen a la consolidación del sabor y la textura del producto. Este hecho ha llevado a que los productores empleen ácidos orgánicos como acético, cítrico y láctico y/o cultivos iniciadores comerciales, que pueden llegar a alterar las propiedades organolépticas del queso original.

Diversos estudios plantean la necesidad de evaluar la capacidad tecnológica, probiótica y antimicrobiana de las BAL autóctonas para ser utilizadas en el diseño de cultivos iniciadores específicos, que garanticen la estandarización de los procesos, preservando al mismo tiempo las características que definen su identidad [2,3,4,5]. Entre los productos lácteos elaborados en Colombia donde la microbiota autóctona tiene una influencia significativa, se encuentran el Queso Doble Crema y el Quesillo, definidos como quesos frescos,

no madurados, de pasta hilada, color blanco crema, consistencia semiblanda y sabor moderadamente ácido; estos quesos son producidos en los Valles de Ubaté y Valle Alto del Magdalena desde donde se han difundido a otras zonas del país [6, 7]. Su producción artesanal involucra la utilización de leche no pasteurizada, obteniéndose un producto con características organolépticas especiales al paladar de los consumidores.

Los microorganismos patógenos más frecuentemente asociados a la producción de quesos tradicionales son *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* responsables de brotes de ETA asociados con el uso de leche cruda y procesos de producción poco higiénicos [8, 9]. Trabajos anteriores realizados en Colombia han demostrado que el queso campesino, el queso doble crema, la cuajada, el queso costeño y el queso de hoja pueden presentar contaminación con patógenos como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*; los cuales llegan a estos alimentos por diferentes factores como la contaminación a partir de las manos del ordeñador, por heces de animales, por contaminación del equipo de ordeño, por aguas contaminadas o por una deficiente cocción en la materia prima [10, 11, 12]. *Listeria monocytogenes*, es un bacilo Gram positivo causante de listeriosis, una grave enfermedad que puede generar desde diarrea hasta meningitis en recién nacidos, es psicrotolerante, soporta pH ácidos y puede llegar a ser halófilo, hecho que dificulta su control en productos lácteos principalmente en quesos frescos [13]. Por su parte, *Salmonella* spp es un bacilo Gram negativo productor de salmonelosis, una de las principales causas de gastroenteritis en humanos y animales. Las infecciones por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis son una causa importante de morbilidad y mortalidad especialmente en niños y personas inmunocomprometidas [14].

El efecto de las BAL autóctonas y sus metabolitos como ácidos orgánicos, dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas frente a microorganismos patógenos, se plantea como una alternativa de conservación, al tiempo que proporciona beneficios a la salud, al prevenir enfermedades gastrointestinales y mejorar la digestión [15]. El presente trabajo busca evaluar la capacidad antimicrobiana de 32 aislados de BAL, seleccionados de acuerdo a su capacidad tecnológica, provenientes Queso Doble Crema y Quesillo frente al crecimiento *in vitro* de *Salmonella typhimurim* y *Listeria monocytogenes*, para su uso potencial en la formulación de cultivos iniciadores autóctonos con efecto bioprotector.

MÉTODOS

Aislados bacterianos y condiciones de cultivo

En este estudio se utilizaron 32 aislados de BAL, obtenidos de Queso Doble Crema (QDC) y Quesillo (Q) producidos en los municipios del Valle de Ubaté y Bajo Magdalena para evaluar su capacidad antimicrobiana frente a *S. typhimurium* y *L. monocytogenes*. Los aislados se obtuvieron en el Laboratorio de Control Calidad (LACMA) de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia y fueron caracterizados molecularmente mediante el análisis de secuencias del gen 16s DNAr en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín en un estudio previo. Así mismo, se les evaluó su capacidad acidificante, proteolítica y lipolítica para valorar su potencial en la formulación de un cultivo iniciador nativo. De las 32 cepas estudiadas, *Lactococcus lactis* (QDC23, QDC18) y *Lactobacillus fermentum* (QDC32) presentaron buena capacidad acidificante y proteolítica. Las cepas de los géneros *Leuconostoc* sp., *Lactococcus* sp (*Lactococcus lactis* QDC18, QDC23 QDC30) y *Lactobacillus* sp. (*Lactobacillus fermentum* QDC32) presentaron buena actividad de la enzima B-galactosidasa, propiedad importante en los cultivos iniciadores desarrolladores de sabor en los procesos de maduración.

Las BAL se criopreservaron a -70°C utilizando caldo De Man Rogosa y Sharpe (MRS, Difco Laboratories, Detroit, USA) para bacilos y Caldo M17 (Difco Laboratories, Detroit, USA) para cocos, adicionadas con glicerol como agente crioprotector [16]. Para la realización de los ensayos, los aislados se reactivaron en los medios de cultivo selectivos ya mencionados, a 30°C por 24 horas en condiciones de anaerobiosis [17].

Las cepas de patógenos o microorganismos indicadores utilizadas fueron *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC® 1331 y *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644, congeladas a -70°C en caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI, Merck, Darmstadt, Alemania) con 30% de glicerol. *Salmonella typhimurium* fue recuperada en agar Rambach (Merck, Darmstadt, Alemania) y *Listeria monocytogenes* fue recuperada en agar PALCAM (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). Después de la incubación a 37°C por 24 horas, ambas cepas fueron subcultivadas en agar tripticasa soya (Merck®) bajo las mismas condiciones [18].

Tamizaje para la detección de la capacidad antimicrobiana

Los 32 aislados de BAL autóctonos fueron evaluados contra las cepas de microorganismos patógenos seleccionados, a partir del método de la mancha en agar descrito por González *et al.* [19]. Para ello, $5\ \mu\text{L}$ del cultivo de cada BAL incubados durante una noche, se sembraron en la superficie de agar MRS o agar M17 (dependiendo del tipo de aislado) y se incubaron a 30°C por 24 horas. Luego del período de incubación, se tomaron 7 mL de agar tripticasa soya semisólido (Merck®, caldo, más 0,7% de agar-agar) previamente inoculados con $100\ \mu\text{L}$ del microorganismo indicador ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) y se adicionaron sobre cada una de las placas de agar. Se incubaron nuevamente a 37°C por 24 horas. Se interpretó como positiva la prueba donde se presentaron zonas de inhibición correspondientes a un halo igual o mayor a 2 mm, con el fin de seleccionar las que mostraran mayor capacidad antimicrobiana simultáneamente para ambos patógenos. Cada procedimiento se realizó por triplicado.

Obtención de extractos libres de células

Los aislados seleccionados se incubaron en 250 mL de caldo MRS o M17, con adición del 10% del inóculo a una concentración aproximada de 10^8 UFC/mL durante 48 horas a 30°C a 150 rpm. Transcurrido este tiempo, las células se retiraron por centrifugación a $10.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C [20]. Cada sobrenadante libre de células se ajustó a un pH de 6,0 con NaOH 1N para inhibir el efecto de ácidos orgánicos y se filtraron a través de membranas de $0,22\ \mu\text{m}$ [21]. Para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes se realizaron seis diluciones sucesivas en base 2 (cada dilución fue realizada por triplicado).

Las Unidades de Actividad evaluadas fueron:

$$1/2 = 2 \times 10^3 \text{ UA/mL}$$

$$1/4 = 4 \times 10^3 \text{ UA/mL}$$

$$1/8 = 8 \times 10^3 \text{ UA/mL}$$

$$1/16 = 16 \times 10^3 \text{ UA/mL}$$

$$1/32 = 32 \times 10^3 \text{ UA/mL}$$

$$1/64 = 64 \times 10^3 \text{ UA/mL}$$

Capacidad antimicrobiana de los extractos libres de células

La capacidad antimicrobiana fue confirmada usando el método de difusión en gel por perforación en placa [19, 22]. Se tomaron 15 mL de agar tripticosa soya semisólido fundido a 45°C y se inocularon con 100 μ L de cada microorganismo patógeno a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL en cajas independientes. Una vez solidificado el agar, se cortaron pozos de 5 mm de diámetro, con el fin de adicionar 50 μ L de las diluciones sucesivas preparadas de cada sobrenadante, por triplicado. Las placas se almacenaron de 3-4°C durante 2 horas para permitir la difusión del extracto y se incubaron a 37°C por 24 h. La actividad antimicrobiana se expresó en Unidades de Actividad por mililitro (UA/mL), la cual está definida como el recíproco de la máxima dilución (base 2) a la cual se obtiene un halo de inhibición igual o superior a 2 mm [20]. La nisina, un agente antimicrobiano producido por *Lactococcus lactis*, que actúa frente a bacterias Gram positivas [23] se utilizó como sustancia inhibidora de referencia por ser la única bacteriocina aprobada legalmente por la Administración de Alimentos y Cosméticos y ha sido utilizada en algunos trabajos a una concentración de 1 g/L [24]. Como control negativo se utilizó caldo MRS y M17 ajustados a un pH de 6.

Análisis estadístico

La capacidad antimicrobiana de los 32 aislados autóctonos sobre los dos microorganismos patógenos fue analizada a través de un diseño completamente aleatorio con un solo factor (Capacidad antimicrobiana) y dos variables respuestas (*L. monocytogenes* y *S. typhimurium*), para hallar las diferencias entre los tratamientos, utilizando un nivel de significancia de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Tamizaje para la detección de la capacidad antimicrobiana

De los 32 aislados de BAL sometidos al método de la mancha en agar se observó que 18 no presentaron capacidad antimicrobiana frente a los dos patógenos evaluados, 14 mostraron actividad frente a *L. monocytogenes* y 8 de ellos frente a *S. typhimurium* (Cuadro 1). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las zonas de inhibición presentadas por las BAL para los dos patógenos evaluados.

La mayor actividad inhibitoria se registró para *L. monocytogenes*, resultados que evidencian una característica relevante descrita para los compuestos antimicrobianos producidos por BAL, quienes presentan una fácil interacción con los lípidos aniónicos de la membrana de las bacterias Gram positivas, favoreciendo la formación de poros, que afectan el estado energético y en consecuencia producen la muerte celular [1]. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados en otros estudios realizados con BAL aisladas de alimentos fermentados [25, 26].

Los aislados identificados como *L. fermentum* (Q6) (QDC32) y *L. casei* (QDC31), a diferencia de los demás, presentaron mayor efecto inhibitorio frente a *S. typhimurium*. Nuestros resultados son similares a los encontrados por otros autores, quienes reportan algunas especies de Lactobacilos con capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas [27, 28] por diversos mecanismos que incluyen la competencia por los nutrientes, la exclusión competitiva y la reducción del pH por la producción de metabolitos como ácido acético y láctico, lo cual podría explicar este comportamiento [29].

Investigaciones anteriores indican que dentro de las BAL aisladas de productos lácteos tradicionales que están generalmente asociadas con inhibición de patógenos se encuentran *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* [19,30]. En este estudio en particular los géneros con mayor actividad fueron *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*.

Capacidad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células

Un paso para la purificación parcial de sustancias antimicrobianas es la obtención de sobrenadantes libres de células con posterior neutralización del pH que facilita la extracción de los metabolitos celulares. En este estudio se seleccionaron los ocho aislados que presentaron capacidad antimicrobiana para ambos patógenos. Se obtuvo el extracto de estos aislamientos, para posterior confirmación de su actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en gel por perforación en placa a diferentes concentraciones. Cada uno de los sobrenadantes estudiados mostró

Cuadro 1. Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas utilizando el método de la mancha en agar.

Cepa	Código	Zona de inhibición (mm)*	
		<i>S. typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Lactococcus sp.</i>			
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q1	–	–
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (CV56)	Q2	–	2,4±0,53
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q5	2,9±0,17	3,5±0,50
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q8	–	–
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q10	–	2,0±0,15
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q13	–	2,0±0,10
<i>Lactococcus lactis</i>	Q3	–	–
<i>Lactococcus lactis</i>	QDC17	–	–
<i>Lactococcus lactis</i>	QDC18	–	–
<i>Lactococcus lactis</i>	QDC23	–	–
<i>Lactococcus lactis</i>	QDC30	–	–
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Q15	–	–
<i>Leuconostoc sp.</i>			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Q12	2,5±0,32	2,7±0,31
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	QDC22	–	2,7±0,46
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	QDC29	–	–
<i>Leuconostoc citreum</i>	QDC20	–	–
<i>Enterococcus sp.</i>			
<i>Enterococcus sp</i>	Q4	–	–
<i>Enterococcus faecium</i>	QDC24	–	–
<i>Enterococcus faecium</i>	QDC25	–	2,0±0,00
<i>Enterococcus faecium</i>	QDC26	–	–
<i>Enterococcus faecium</i>	QDC27	–	–
<i>Enterococcus lactis</i>	Q7	2,5±0,40	2,7±0,57
<i>Pediococcus sp.</i>			
<i>Pediococcus acidilactici</i>	QDC16	–	–
<i>Pediococcus acidilactici</i>	QDC21	–	–
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	QDC19	–	–
<i>Streptococcus sp.</i>			
<i>Streptococcus infantarius</i>	Q11	2,7±0,10	2,5±0,50
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	Q14	–	2,7±0,57
<i>Lactobacillus sp.</i>			
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Q6	10,0±0,06	5,0±0,60
<i>Lactobacillus fermentum</i>	QDC32	12,0±1,00	8,0±2,00
<i>Lactobacillus casei</i>	QDC31	18,0±0,58	9,0±3,05
<i>Weissella sp.</i>			
<i>Weissella viridescens</i>	QDC28	–	–
<i>Bacillus sp.</i>			
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Q9	2,0±0,00	3,3±0,58

* Media ± DS de determinaciones por triplicado.

(–) Ausencia de inhibición. Halos <2 mm se consideraron inhibición negativa.

una actividad antimicrobiana variable dependiendo del patógeno, presentando un mejor efecto inhibitorio para *Listeria monocytogenes* que para *Salmonella typhimurium* (Figura 1).

Dentro de los sobrenadantes con mayor capacidad se encuentran *L. lactis* subsp. *lactis* (Q5), el cual presentó una actividad de 64.000 UA/mL para *L. monocytogenes* y de 4.000 UA/mL para *S. typhimurium*, resultados que concuerdan con los reportados por otros autores [31, 32, 33], quienes observaron que el efecto antimicrobiano de esta BAL está generalmente asociada a bacterias Gram positivas, especialmente frente a *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, existen reportes de efecto antimicrobiano de *Lactococcus lactis* contra Gram negativos [34]. El mecanismo de sensibilidad no ha sido bien determinado, aunque se ha descrito que pequeñas lesiones en la membrana celular externa puede facilitar el acceso de la sustancia antimicrobiana a la membrana citoplasmática de las mismas [35]. Entre el grupo de las BAL, *Lactococcus lactis* juega un papel importante en los procesos de fermentación en la industria láctea. Su papel esencial en la acidificación de la leche, contribuye considerablemente a la formación del sabor en los quesos mediante la producción de péptidos y aminoácidos, además impide el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorantes y proporciona las condiciones óptimas para la maduración, razones por las cuales se utiliza en cultivos iniciadores comerciales para la producción de quesos y leches fermentadas [36].

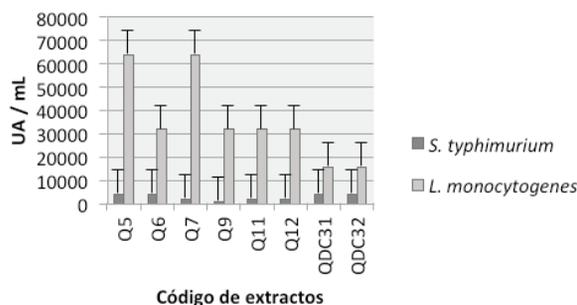
Por su parte, *Enterococcus lactis* (Q5) presentó una actividad de 64.000 UA/mL para *L. monocytogenes*, resultados acordes con los reportados por Favaro *et al.* [37] y Aran *et al.* [38]. La actividad frente a *S. typhimurium* fue baja (2.000 UA/mL). No se encontraron estudios que

asocien a los enterococos con inhibición de este patógeno Gram Negativo, debido a que estos microorganismos presentan una capa de lipopolisacáridos en su membrana externa que actúa como una barrera de permeabilidad para la célula, inhibiendo la entrada de moléculas hacia la membrana citoplasmática [39].

Así mismo, el extracto de *Lactobacillus fermentum* mostró una actividad de 32.000 UA/mL para *L. monocytogenes* y de 4.000 UA/mL para *S. typhimurium* (Figura 2), resultados similares a los mencionados por otros autores, quienes han trabajado el efecto de *Lactobacillus fermentum* en el control de la proliferación de bacterias patógenas tanto Gram negativas como Gram positivas en productos lácteos fermentados naturalmente. Este microorganismo ha sido descrito como productor de diferentes compuestos antimicrobianos tales como ácidos orgánicos, catabolitos de oxígeno, bacteriocinas, péptidos de más bajo peso molecular y otros compuestos como reuterina y reuteriicina [40].

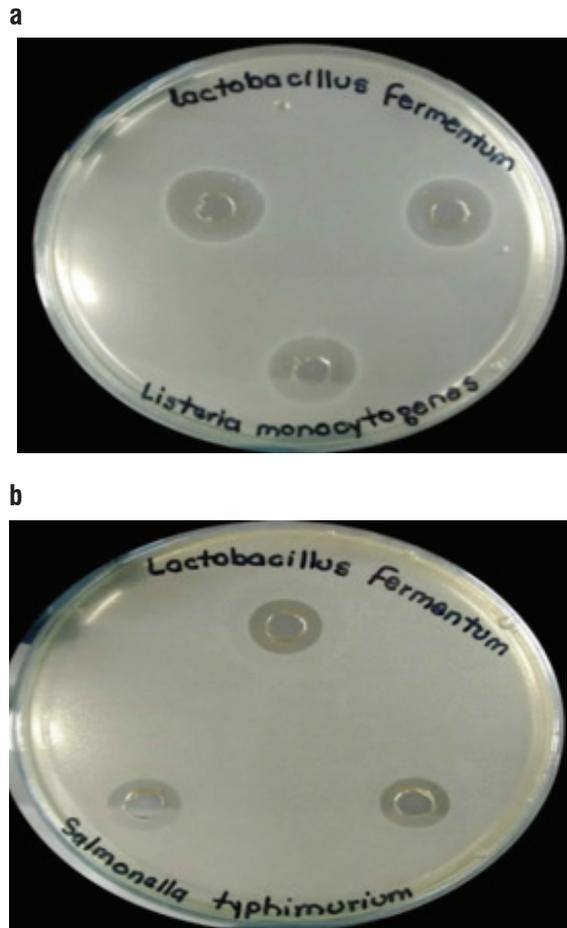
Se han reportado cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de alimentos como leche de cabra, queso y productos fermentados, con capacidad para producir sustancias antimicrobianas con efecto antilisterial [41]. Daba *et al.* [42] aislaron una cepa de *L. mesenteroides* UL5 de queso Cheddar productora de una bacteriocina denominada mesenterocina, cuya actividad del extracto libre de células fue >11,703 UA/mL para *L. monocytogenes*. Otras bacterias Gram negativas como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Salmonella choleraesuis*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens*, y *Yersinia enterocolitica* no se vieron afectadas por el sobrenadante. En este estudio el sobrenadante evaluado de *L. mesenteroides* presentó una actividad frente a *L. monocytogenes* de 32.000 UA/mL y una actividad baja para *S. typhimurium* de 2.000 UA/mL.

Figura 1. Capacidad antimicrobiana de sobrenadantes de BAL en UA/mL contra *L. monocytogenes* y *S. typhimurium*



Aunque se presentó efecto inhibitorio de los aislados para los dos patógenos, principalmente frente a *Listeria monocytogenes*, se hace necesario la evaluación tecnológica de algunas de las características de los extractos, tales como el efecto a tratamiento térmico, la estabilidad a diferentes pH y el comportamiento frente a enzimas proteolíticas que permitan obtener mayor información sobre el tipo de sustancia antimicrobiana presente y definir a través de técnicas moleculares su identidad como compuesto tipo bacteriocina, descartando la actividad antimicrobiana por compuestos como ácidos orgánicos o peróxido de hidrógeno. Además los aislados con actividad antimicrobiana pueden ser utilizados en la formulación

Figura 2. Detección de la capacidad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células por el método de difusión en gel por perforación en placa.



a. *L. fermentum* (QDC31) frente a *L. monocytogenes*; **b.** *L. fermentum* (QDC31) frente *S. typhimurium*.

de un cultivo iniciador autóctono para la elaboración de productos lácteos que contribuya a su inocuidad sin alterar sus características sensoriales propias.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación servirán de apoyo para la aplicación de aislados de BAL autóctonas con capacidad antimicrobiana como bioconservantes naturales en la industria láctea. Sin embargo es relevante la identificación bioquímica y molecular de los metabolitos obtenidos para determinar si se trata o no de compuestos tipo bacteriocinas. La capacidad antimicrobiana exhibida frente a *Listeria mo-*

nocytogenes, podría ser una alternativa eficiente para el control de este patógeno, principalmente en quesos frescos y madurados.

Este trabajo abre la puerta a nuevos estudios para la formulación de cultivos iniciadores a partir de BAL autóctonas que puedan ser usadas en la elaboración artesanal de productos lácteos. Sin embargo, antes de cualquier consideración definitiva de estas cepas, deben ser cuidadosamente evaluados para descartar la presencia de todos los factores de virulencia conocidos con el fin de determinar qué riesgos potenciales podrían estar involucrados en su uso.

REFERENCIAS

- [1] FAVARO, L., PENNA, A. and TODOROV, S.D. Bacteriocinogenic LAB from cheeses—Application in biopreservation?. Trends in Food Science & Technology, 41(1), 2015, p. 37-48.
- [2] TERZIĆ-VIDOJEVIĆ, A., TONKOVIĆ, K., PAVUNC, A.L., BEGANOVIĆ, J., STRAHINIĆ, I., KOJIĆ, M. and GREGUREK, L. Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. LWT-Food Science and Technology, 63(1), 2015, p. 298-306.
- [3] LEITE, A., MIGUEL, M., PEIXOTO, R.S., RUAS-MADIEDO, P., PASCHOALIN, V., MAYO, B. and DELGADO, S. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. Journal of Dairy Science, 98(6), 2015, p. 3622-3632.
- [4] ZANIRATI, D.F., ABATEMARCO, M., DE CICCOSANDES, S.H., NICOLI, J.R., NUNES, Á.C and NEUMANN, E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. Anaerobe, 32, 2015, p. 70-76.
- [5] TERZIĆ-VIDOJEVIĆ, A., TONKOVIĆ, K., PAVUNC, A.L., BEGANOVIĆ, J., STRAHINIĆ, I., KOJIĆ, M. and GREGUREK, L. Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. LWT-Food Science and Technology, 63(1), 2015, p. 298-306.
- [6] DURANGO, M., SEPÚLVEDA, U., GUTIÉRREZ, M. y LONDOÑO, A. Caracterización de ácidos grasos, diacetilo y acetoina en Quesillo colombiano. Vitae, 19(1), 2012, p. 376-378.

- [7] NOVOA, C.F. y LÓPEZ, N.C. Evaluación de la vida útil sensorial del Queso Doble Crema con dos niveles de grasa. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 55(2), 2008, p. 91-99.
- [8] CARRASCOSA, C., MILLÁN, R., SAAVEDRA, P., JABER, J.R., RAPOSO, A. and SANJUÁN, E. Identification of the risk factors associated with cheese production to implement the hazard analysis and critical control points (HACCP) system on cheese farms. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 2016, p. 2606-2616.
- [9] MONTEL, M.C., BUCHIN, S., MALLET, A., DELBES-PAUS, C., VUITTON, D.A., DESMASURES, N. and BERTHIER, F. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 2014, p. 136-154.
- [10] COLOMBIA. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD Y MINISTERIO DE PROTECCIÓN SOCIAL. Evaluación de Riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia. Bogotá (Colombia): Imprenta Nacional de Colombia, 2011, 22 p.
- [11] GALLEGOS, J.G., ARRIETA, G., MÁTTAR, S., POUTOU, R., TRESPALACIOS, A. and CARRASCAL, A. Frecuencia de *Listeria* spp., en quesos colombianos costeños. *Revista MVZ Córdoba*, 12(2), 2007, p. 996-1012.
- [12] ALBARRACIN, F.Y., SARMIENTO, P., CARRASCAL, A.K. y MERCADO, M. Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp en quesos frescos (queso de hoja, cuajada) y queso Doble Crema producidos y comercializados en el Municipio de Pamplona, Norte de Santander. *Bistua*, 4(2), 2007, p.30-41.
- [13] COELHO, M.C., SILVA, C.C.G., RIBEIRO, S.C., DAPKEVICIUS, M. and ROSA, H. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 2014, p. 53-59.
- [14] MILLER, S., AMADI, V., STONE, D., JOHNSON, R., HARIHARAN, H. and ZIEGER, U. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. in small Indian mongooses (*Herpestes auro-punctatus*) in Grenada, West Indies. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37(4), 2014, p. 205-210.
- [15] MENDEZ-ROJAS, M.I. Identificación bioquímica y evaluación de la capacidad bacteriocinogénica de las bacterias ácido lácticas aisladas de quesillos artesanales [Tesis Ingeniero de alimentos]. Cuenca (Ecuador): Universidad del Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería de Alimentos, 2016, p. 5.
- [16] LIU, H., ZHANG, L., YI, H., HAN, X. and CHI, C. Identification and characterization of plantaricin Q7, a novel plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* Q7. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 2016, p. 386-390.
- [17] OUALI, F.A., AL KASSAA, I., CUDENNEC, B., ABDALLAH, M., BENDALI, F., SADOON, D. and DRIDER, D. Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 2014, p. 116-124.
- [18] RIPAMONTI, B., AGAZZI, A., BERSANI, C., DE DEA, P., PECORINI, C., PIRANI, S. and TIRLONI, E. Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. *Anaerobe*, 17(3), 2011, p. 97-105.
- [19] GONZÁLEZ, L., SANDOVAL, H., SACRISTÁN, N., CASTRO, J.M., FRESNO, J.M. and TORNADIJO, M.E. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, 18(6), 2007, p. 716-722.
- [20] SANKAR, N.R., PRIYANKA, V.D., REDDY, P.S., RAJANIKANTH, P., KUMAR, V.K. and INDIRA, M. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from cow milk. *International Journal of Microbiological Research*, 3(2), 2012, p. 133-137.
- [21] IRANMANESH, M., EZZATPANAH, H. and MOJGANI, N. Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products. *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), 2014, p. 355-359.
- [22] HERREROS, M.A., SANDOVAL, H., GONZÁLEZ, L., CASTRO, J.M., FRESNO, J.M. and TORNADIJO, M.E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*, 22(5), 2005, p. 455-459.
- [23] SIROLI, L., PATRIGNANI, F., SERRAZANETTI, D.I., VANNINI, L., SALVETTI, E., TORRIANI, S. and LANCIOTTI, R. Use of a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain, combined with natural antimicrobials, to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples. *Food Microbiology*, 54, 2016, p. 11-19.

- [24] AMADO, I.R., FUCIÑOS, C., FAJARDO, P., GUERRA, N.P. and PASTRANA, L. Evaluation of two bacteriocin-producing probiotic lactic acid bacteria as inoculants for controlling *Listeria monocytogenes* in grass and maize silages. *Animal Feed Science and Technology*, 175(3), 2012, p. 137-149.
- [25] DE ALMEIDA-JÚNIOR, W., DA SILVA-FERRARI, Í., DE SOUZA, J.V., DA SILVA, C., DA COSTA, M.M. and DIAS, F.S. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control*, 53, 2016, p. 96-103.
- [26] TERZIĆ-VIDOJEVIĆ, A., TONKOVIĆ, K., PAVUNC, A.L., BEGANOVIĆ, J., STRAHINIĆ, I., KOJIĆ, M. and GREGUREK, L. Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 2015, p. 298-306.
- [27] ABBAS, MM. and MAHASNEH, AM. Isolation of *Lactobacillus* strains with probiotic potential from camel's milk. *African Journal of Microbiology Research*, 8(15), 2014, p. 1645-1655.
- [28] MAHMOUDI, I., BEN MOUSA, O., KHALDI, T., KEBOUCHI, M., SOLIGOT, C., LE ROUX, Y. and HAS-SOUNA, M. Functional in vitro screening of *Lactobacillus* strains isolated from Tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic. *Small Ruminant Research*, 137, 2016, p. 91-98.
- [29] KUMAR, A. and KUMAR, D. Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. *Anaerobe*, 33, 2015, p. 117-123.
- [30] LEITE, A., MIGUEL, M., PEIXOTO, R.S., RUAS-MADIEDO, P., PASCHOALIN, V., MAYO, B. and DELGADO, S. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 2015, p. 3622-3632.
- [31] KRUGER, M.F., DE SOUZA-BARBOSA, M., MIRANDA, A., LANDGRAF, M., DESTRO, M.T., TODOROV, S.D. and DE MELO-FRANCO, B. Isolation of bacteriocinogenic strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from Rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) and evidences of production of a variant of nisin with modification in the leader-peptide. *Food control*, 33(2), 2013, p. 467-476.
- [32] SIROLI, L., PATRIGNANI, F., SERRAZANETTI, D.I., VANNINI, L., SALVETTI, E., TORRIANI, S. and LANCIOTTI, R. Use of a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain, combined with natural antimicrobials, to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples. *Food Microbiology*, 54, 2016, p. 11-19.
- [33] LEE, N.K., HAN, K.J., SON, S.H., EOM, S.J., LEE, S.K. and PAIK, H.D. Multifunctional effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24 isolated from kimchi. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 2015, p. 1036-1041.
- [34] PERIN, L.M. and NERO, L.A. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. *BMC Microbiology*, 14(1), 2014, p. 36.
- [35] RODRIGUEZ, E., CALZADA, J., ARQUÉS, J.L., RODRIGUEZ, J.M., NUNEZ, M. and MEDINA, M. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal*, 15(1), 2005, p. 51-57.
- [36] PISANO, M.B., FADDA, M.E., MELIS, R., CIUSA, M.L., VIALE, S., DEPLANO, M. and COSENTINO, S. Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. *Food Control*, 51, 2015, p. 1-8.
- [37] FAVARO, L., BASAGLIA, M., CASELLA, S., HUE, I., DOUSSET, X., DE MELO-FRANCO, B. and TODOROV, S.D. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiology*, 38, 2014, p. 228-239.
- [38] ARAN, H., BISCOLA, V., EL-GHAISH, S., JAFFRÉS, E., DOUSSET, X., PILLOT, G. and HWANHLEM, N. Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: purification, characterization and safety evaluation. *Food Control*, 54, 2015, p. 126-134.
- [39] SCHELEGUEDA, L.I., VALLEJO, M., GLIEMMO, M.F., MARGUET, E.R. and CAMPOS, C.A. Synergistic antimicrobial action and potential application for fish preservation of a bacteriocin produced by *Enterococcus mundtii* isolated from *Odontesthes platensis*. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 2015, p. 794-801.
- [40] TULUMOĞLU, Ş., KAYA, H.I. and ŞİMŞEK, Ö. Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. *Anaerobe*, 30, 2014, p. 120-125.