



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**



**“Evaluación de la actividad antimicrobiana de una
cepa de *Lactobacillus paracasei* contra bacterias
causantes de ETA”**

TESIS

Para obtener el título de:

Licenciado Químico Farmacobiólogo

Presenta:

Mayrena del Carmen Santos Santiago

Directores:

MC. Juan Carlos Benítez Serrano

MC. Laura Martínez Pérez

Diciembre 2018

*"Son nuestras decisiones las que nos muestran lo que podemos llegar a ser.
Mucho más que nuestras propias habilidades."*

J.K. Rowling.



Dedicatorias.

A mis padres...

Mamá

Aún recuerdo tus lagrimas el día que partí de casa, los múltiples consejos y cuidados que como toda madre siempre me has dado, la eterna frase que aún no logro comprender "cuando seas madre, entonces me entenderás", pero que sin duda siempre agradeceré, pues sé que siempre te preocupas por mí. Tengo presente las veces que me animaste cuando las cosas no marchaban bien, las llamadas de atención cuando sentías que no estaba haciendo lo correcto, e incluso todas las ocasiones en que has solapado mis locuras, riéndonos cuando me dices "pero si tu papá

se enoja, te las arreglas con él". Mami a pesar de que muchas veces no estemos de acuerdo estaré siempre agradecida por todo el esfuerzo y los sacrificios que por mí has hecho.

Papá:

Tus consejos siempre serenos, palabras tranquilas y la paciencia que siempre has tenido conmigo, tus abrazos sinceros cada vez que tenía que regresar a la escuela después de pasar unos pocos días en casa, siempre respetando mis decisiones para permitirme aprender lo bueno y lo malo de ellas pero sin nunca estar detrás de mí respaldándome, gracias por tu manera de darme las herramientas para abrirme paso en un mundo nuevo, alentándome a que donde quiera que estén mis sueños ir a buscarlos, disculpa todas mis locuras a través de los años, no dejare de hacerlas, pero sé que aun así, me seguirás abrazando.

A mis abuelos...

Abuelita... mi gugu

La mujer que desde el día en que nací hasta hoy a mis 24 años no me ha dejado sola, la mujer que me enseñó todo lo que se desde leer hasta ser mi primera maestra de química, transmitiéndome su amor por esta carrera. A ti que siempre te mostraste orgullosa de mí cuando elegí ser química como tú y que más cerca que nadie viste y te preocupaste por mis desvelos o las veces que no comía cuando todo se volvía muy pesado, cada día me alentaste a ser mejor, me ponías toda la atención del mundo cuando te platicaba algo nuevo que había aprendido, o que por fin había obtenido resultados en esta tesis; siempre tendré presente como te enojabas cuando te decía que las reglas de la química ya no eran las mismas que tú me enseñaste, para al final solo decirme, "pero ¿si te sirven de algo verdad?", preocupada de que me hubieras enseñado mal, gugu no hay día en que algo de lo que tú me hayas enseñado no me sirva.

Gugu...tú simplemente debes ser eterna.

Abuelito...

Don Andrés!!, mi eterno alcahuete, el hombre que desde pequeña jamás me ha negado nada, su amor, su apoyo y todo lo que yo he necesitado, siempre mostrándote orgulloso de cada uno de mis logros, abuelito, tu que siempre me has respaldado, sin pedirme nada más que "echarle ganas a los estudios", que cada que es posible ir a casa me recibes contento de que pueda volver, nunca has dudado un solo segundo en alentarme y hacer todo lo que puedas para apoyarme con tal de que yo logre todo lo que me propongo, aplaudiéndome cuando sabes que al fin he logrado algo, gracias porque desde que yo tengo uso de razón siempre ha estado ahí "sin echarse para atrás".

Hermano...

Nunca olvidare la más especial muestra de apoyo y comprensión que me has dado, y que a pesar de todas nuestras diferencias siempre me has apoyado y cuidado. Gracias por muy a tu manera demostrarme lo que como hermano nos une, nuestro camino.

A ustedes que siempre serán pilares en mi vida, y que nunca lograre agradecerles lo suficiente todo lo que he hecho por mí, este trabajo es una pequeña manera de decirles... gracias por todo, lo hemos logrado.

Agradecimientos.

Maestro Juan Carlos...

¡¡Jefazo!!, mi mentor y amigo, a su lado he aprendido y vivido muchas cosas, sin duda me ha ayudado a crecer como profesionalista y como ser humano, gracias por toda la paciencia que me tuvo, por las veces que erre y que con total tranquilidad me decía, ni modos May a volver a intentarlo, así es esto; todo el tiempo que dedico a enseñarme, a demostrarme que si bien las habilidades nos ayudan, es el trabajo constante y el deseo de lograr algo lo que hace la diferencia. Gracias por apostar por mí en este proyecto, por preocuparse y por animarme a seguir adelante; gracias por cada día vivido, cada conocimiento adquirido, y cada enseñanza compartida...recuerde hombro con hombro... siempre.. ¡¡Lo quiero mucho jefazo!!..

Maestra Laura.

Gracias por sus enseñanzas desde el día en que me dio clases, por ser quien permitió mi acercamiento a estas áreas, y por el tiempo que tomo en enseñarme y apoyarme no solo durante este trabajo si no con consejos que me permitieran resolver más allá de una duda o conflicto.

A mis sinodales...

Maestra Gloria, maestro Carlos y maestra Mari Cruz, gracias primeras por aceptar ser parte de este trabajo, gracias a los tres por su tiempo en cada una de las revisiones, por siempre hacerme aportaciones que mejorarán mi calidad como estudiante y que sin duda sumaran a mi desempeño como profesionalista.

Maestra Maricela Torres y Soto, Maestra Rosalía Contreras Mora...

Por ser las primeras maestras en marcar mi vida estudiantil en esta universidad, por ser además quienes antes que nadie me dieron su voto de confianza, por los conocimientos compartidos y por todas las pláticas tenidas, donde siempre existió comprensión y palabras de ánimo, por todo eso y más queda con ustedes mi cariño y respeto.

A todos mis amigos...

Dicen que los amigos son la familia que la vida nos permitió escoger, y sin duda yo tengo los mejores...

Necesitaría escribir otra tesis solo para agradecerles uno a uno todo lo que han hecho por mí, cada uno a su manera, con sus propios consejos, su apoyo y sus regaños, con diferentes experiencias compartidas y recuerdos que conservare siempre, aprendí que las verdaderas amistades perduran al paso de tiempo, las distancias y las diferencias, que siempre pesa más los lazos que nos unen que todo aquello que nos separa, y que aun así después de meses sin vernos, al volver a hacerlo nada ha cambiado; gracias a todos ustedes que siempre fueron mi paño de lágrimas, haciéndose presentes de alguna manera, un abrazo, una llamada o un mensaje, pero siempre estando ahí cuando más los he necesitado, no duden que siempre estaré para ofrecerles un poco de lo que ustedes a mí.

Con todo mi cariño, gracias a todos.

Solo un favor.... ¡¡No me digan Carmen!!

CONTENIDO	PÁGINAS
I.INTRODUCCIÓN	1
II.MARCO TEÓRICO	2
2.0 Bacterias ácido lácticas (BAL)	2
2.1 Género <i>Lactobacillus</i>	4
2.2 Compuestos antimicrobianos producidos por BAL	4
2.2.1 Ácidos orgánicos	5
2.2.2 Diacetilo y Acetaldehído	6
2.2.3 Peróxido de hidrógeno	7
2.2.4 Bacteriocinas	7
2.3 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA)	8
2.3.1 Epidemiología	9
2.3.2 Reservorio y periodo de incubación	10
2.4 MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA	11
2.4.1 Clasificación	11
2.4.2 Método de microdilución	11
2.4.3 Método de difusión en agar en pozo	12
2.4.4 Difusión en agar por el método de la doble capa	13
III. MARCO DE REFERENCIA	14
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
V. JUSTIFICACIÓN	18
VI. OBJETIVOS	19
VII. HIPÓTESIS	20
VIII. DISEÑO DEL ESTUDIO	21
IX. MATERIALES Y METODOLOGÍA	23
9.0 METODOLOGIA	23

9.1 Cultivo de cepas bacterianas de desafío (asociadas a ETA)	23
9.2 Preparación del inóculo a la densidad del 0,5 del estándar de MacFarland.	23
9.3 Evaluación de la actividad inhibitoria de la cepa <i>L. paracasei</i> por difusión en agar por el método de doble capa	23
9.4 Obtención de extracto libre de células de <i>L. paracasei</i>	24
9.5 Pruebas de antagonismo por el método de difusión en agar en pozo	24
9.6 Concentración del extracto de <i>L. paracasei</i> por evaporación a presión reducida	24
9.7 Pruebas de antagonismo del extracto concentrado de <i>L. paracasei</i> sometido a extracciones con distintos disolventes orgánicos	25
9.8 Prueba de concentración mínima inhibitoria por microdilución	25
9.9 ESQUEMAS DE TRABAJO	26
X. RESULTADOS Y DISCUSION	32
XI. CONCLUSIONES	42
XII. PERSPECTIVAS	43
XIII. BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS PÁGINAS

Figura 1. Determinación de la actividad antimicrobiana de <i>L. paracasei</i> JLM por ensayos de antagonismo a través del método de difusión en agar en pozo.	33
Figura 2. Resultados de los ensayos de antagonismo de <i>L. paracasei</i> JLM versus cepas de desafío asociadas a ETA mediante difusión en agar por el método de la doble capa.	36
Tabla 1. Resultados de las pruebas de antagonismo por el método de difusión en agar en pozo del extracto libre de células recuperado de la <i>L. paracasei</i> JLM a las 48h a las concentraciones 1x y 10x frente a diferentes cepas de desafío causantes de ETA	32
Tabla 2. Resultados de las pruebas de capacidad antagónica de <i>L. paracasei</i> JLM mediante difusión en agar por el método de la doble capa.	34
Tabla 3. Resultados de la evaluación de la capacidad antagónica de la fracción activa del extracto libre de células de <i>L. paracasei</i> JLM 10x obtenida con éter etílico por el método de microdilución y determinación de la concentración mínima inhibitoria.	37
Tabla 4. Resultados de la evaluación de la capacidad antagónica de la fracción activa del extracto libre de células de <i>L. paracasei</i> JLM 10x obtenida con acetato de etilo por el método de microdilución y determinación de la concentración mínima inhibitoria.	38
Tabla 5. Evaluación de la capacidad antagónica de la fracción activa del extracto libre de células de <i>L. paracasei</i> JLM 10x obtenida con acetona mediante el método de microdilución y determinación de la concentración mínima inhibitoria.	39

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue demostrar la capacidad antimicrobiana de una cepa de *Lactobacillus paracasei* y de extractos obtenidos de la misma frente a diversas cepas bacterianas

previamente caracterizadas conocidas por causar ETA. Se realizaron pruebas de antagonismo por el ensayo de difusión en agar por el método de la doble capa para evaluar la actividad antagónica de *L. paracasei* JLM frente a las cepas de desafío *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7 ATCC 70092, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae* 01, *V. cholerae* 01 (Inaba), *V. cholerae* 01 (Ogawa), *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *Brucella abortus* S19 y *B. abortus* RB51. Asimismo, se realizaron ensayos de antagonismo por el método de difusión en agar con el extracto crudo libre de células E-JLM (1x) y el extracto libre de células concentrado 10 veces (10x) frente a las cepas de desafío anteriormente nombradas. Posteriormente el E-JLM 10x fue sometido a extracciones con disolventes orgánicos obteniéndose fracciones activas con éter etílico, acetato de etilo y acetona, dichas fracciones se evaluaron por ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a las cepas de desafío con el propósito de demostrar las concentraciones mínimas requeridas de estas fracciones para inhibir el desarrollo de dichas cepas y determinar cuáles son más o menos susceptibles a esta actividad. Los resultados obtenidos nos permitieron demostrar que *Lactobacillus paracasei* JLM presenta un amplio espectro antimicrobiano sobre las cepas contra las cuales se le desafío, aportando datos con la capacidad de ser utilizados posteriormente en nuevos estudios con el fin de volver a las BAL una alternativa real y aplicable para la disminución de las ETA. En conclusión, la cepa de *L. paracasei* JLM presenta un amplio espectro antimicrobiano frente a cepas causantes de ETA y un gran potencial para futuras aplicaciones en la industria de los alimentos y biotecnológicas.

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) hoy en día son motivo de interés y de estudio por parte de los investigadores, estas bacterias se caracterizan principalmente por la producción de ácido láctico como resultado del metabolismo de los carbohidratos, y son mundialmente conocidas por su utilidad para favorecer la reposición de la microbiota intestinal y de mejorar el funcionamiento de la misma, sin embargo más recientemente se ha estudiado la capacidad de estas bacterias para inhibir el desarrollo de diversas bacterias patógenas y se ha dado notoriedad a su posible participación en el control de especies patógenas de relevancia en la industria alimentaria.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son hoy en día motivo de preocupación generalizada ya que en el mundo la prevalencia de estas enfermedades se ha vuelto un problema de salud pública mayor debido a las complicaciones y muertes provocadas por estas enfermedades, además de que existe una amplia variedad de cepas patógenas capaces de generar estos padecimientos volviendo aún más complejo el control de las mismas.

En la actualidad se han realizado estudios que nos han permitido conocer los usos potenciales de las bacterias ácido lácticas (BAL) en diferentes campos de la industria y la biotecnología, con lo cual se buscan introducir nuevas alternativas de conservación, prevención e incluso de tratamientos industriales y patologías causadas por diversas bacterias. Muchos avances obtenidos sobre la utilización de los metabolitos producidos por las BAL hacen hincapié en su uso favorable en procesos de industrialización y conservación de los alimentos con el fin de evitar enfermedades asociados a estos, ya que la utilización de los compuestos producidos por las BAL promete ser una solución favorable en el control de estos patógenos, la eliminación de conservadores clásicos y poco efectivos para ello y como consecuencia la disminución de las ETA. En el presente trabajo se abordaran a las BAL como agentes con potencial acción antimicrobiana debido a la producción de diversos compuestos que presentan esta característica frente a bacterias patógenas que son conocidas por ocasionar ETA; esto siendo demostrado mediante diferentes ensayos de antagonismo.

II. MARCO TEÓRICO

Las bacterias son microorganismos unicelulares independientes que se diferencian de las células eucariotas en no poseer un núcleo limitado por una membrana y, en general, carecen de orgánulos intracelulares. Se pueden encontrar en todos los hábitats incluidos los alimentos y el cuerpo humano. Se caracterizan por una gran diversidad metabólica y fisiológica. Por ello, la clasificación de las bacterias desde sus inicios tuvo que incluir también caracteres metabólicos, es decir, ensayos en los que se determina la capacidad de transformar unos compuestos en otros, como por ejemplo, azúcares en ácidos orgánicos.

2.0 Bacterias ácido lácticas (BAL)

El término BAL engloba a un grupo heterogéneo de microorganismos cuya característica definitoria es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares. Dentro de este grupo se reconoce la existencia de microorganismo aerobios y anaerobios (estrictos y facultativos). Las BAL agrupan a diversos microorganismos caracterizados por ser: Gram positivo, no formadores de esporas, inmóviles, negativos a pruebas de catalasa y oxidasa y que tienen forma de cocos y bacilos de longitud variable y de un grosor de entre 0.5 - 0.8 micrómetros (Parra-Huertas, 2010). Estos microorganismos fermentan azúcares como la glucosa y lactosa para generación de ácido láctico. Algunos de los géneros más representativos de este grupo son: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Pediococcus*.

Además de todas las características fisiológicas y bioquímicas antes mencionadas, es posible clasificarlos por su metabolismo, en homofermentativos y heterofermentativos, siendo los primeros los que producen exclusivamente ácido láctico, mientras que los segundos, producen además ácido acético, etanol y dióxido de carbono (Martín del Campo et al., 2008).

En cuanto a la tolerancia de las temperaturas, las bacterias ácido lácticas son mayormente mesófilas, aunque alguna de estas son capaces de crecer a temperaturas bajas de 5°C y otras hasta 45°C; estas bacterias en adición toleran bien concentraciones relativamente elevadas o bajas de pH en comparación con otras bacterias, algunas de estas pueden desarrollarse a pH 3, otras entre 6 y 9; sin embargo, la mayoría de ellas crecen a un pH de entre 4 y 4.5 (Jay, 2002). Este grupo de microorganismos carece de la enzima catalasa, la cual degrada el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y requiere de un grupo porfirínico (citocromos) para realizar esta función, las

BAL son incapaces de sintetizarlo, y por tanto estos microorganismos no poseen dicha enzima (Prescott et al., 2002).

Además, el rendimiento en cultivo de estas bacterias y su crecimiento es muy limitado formando colonias muy pequeñas, esto debido a que sus capacidades anabólicas son muy carentes (Walker et al., 2004).

Las mayoría de las BAL obtienen su energía solo del metabolismo de los carbohidratos y compuestos relacionados que utilizan para su fermentación, por lo que su desarrollo está restringido a ambientes ricos en azúcares, volviendo a este grupo bacteriano muy exigente en su nutrición (Madigan et al., 2004).

Aunque las BAL comparten características que permiten su agrupación, existen diferencias marcadas entre ellas, creando subgrupos según la naturaleza de sus productos finales, los cuales se forman durante la fermentación de los azúcares.

Existen dos clasificaciones para las BAL según la manera en como fermentan los azúcares (hexosas y pentosas), siendo estas divididas en *homofermentativas* o *heterofermentativas*. Las BAL homofermentativas son aquellas que utilizan la glucólisis vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), resultando como producto final el ácido láctico, mientras que las heterofermentativas son las que usan la vía 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa (6-PG/PK) de las pentosas fosfato, produciendo cantidades equivalentes de ácido láctico, dióxido de carbono (CO₂) y etanol (o ácido acético) como productos principales.

Además de las dos vías de fermentación que las bacterias ácido lácticas pueden utilizar, estas han sido subdivididas en tres categorías metabólicas: *homofermentativas estrictas* (solo pueden fermentar hexosas por la glucólisis), *heterofermentativas estrictas* (usan solamente la vía 6PG/PK) y *heterofermentativas facultativas* (las bacterias que se encuentran en esta categoría tienen la cualidad de utilizar ambas vías de fermentación adecuándose a las condiciones de cultivos a las cuales se enfrenten, tales como la concentración de glucosa, pH y la restricción de nutrientes, pasando del metabolismo homofermentativo al heterofermentativo cuando estas condiciones se modifican (Jay, 2000; Axelsson, 2004).

Las BAL son incapaces de sintetizar porfirianas hémicas, por lo cual se consideran anaerobias, sin embargo, la sensibilidad al oxígeno puede ser muy variable, según las cepas: desde

anaerobias estrictas, aerotolerantes y anaerobias facultativas. Otra de las características importantes y compartidas de las BAL es la ausencia de una catalasa hémica, no obstante bajo ciertas condiciones, algunas bacterias son capaces de tomar grupos hemo externos formando catalasas no hémicas llamadas pseudocatalasas (Prescott et al., 2002).

2.1 Género *Lactobacillus*

Lactobacillus es considerado el género más grande dentro de las BAL, comprende alrededor de 80 especies reconocidas en tres grupos, esto basado en sus características fermentativas: *Grupo 1* (formado por especies homofermentativas estrictas), *Grupo 2* (formado por especies heterofermentativas facultativas) y *Grupo 3* (formado por especies heterofermentativas estrictas) (Jay, 2000; Axelsson, 2004).

En cuanto a sitios de colonización las especies del grupo 1 se asocian principalmente con el hombre y animales, ya que estas se pueden encontrar en la cavidad oral, contenido intestinal y vagina de mamíferos; mientras que las especies del grupo 2 y 3 están asociadas con los alimentos, en los cuales se llevan a cabo fermentaciones controladas o causan deterioro especialmente en productos empacados refrigerados (Madigan et al., 2004).

El género *Lactobacillus* por lo general resiste mejor las condiciones de acidez que las restantes BAL y son capaces de crecer bien a valores de pH alrededor de 4 ó 5. Esta cualidad permite que sean aisladas de forma selectiva a partir de muestras naturales, utilizando medios de cultivo de pH ácido que contengan carbohidratos.

Algunas bacterias de este género son consideradas benéficas debido a que producen vitamina K, lactasa y sustancias antimicrobianas como acidolina, acidolfina, lactocidina y bacteriocinas, las cuales ayudan a combatir y prevenir infecciones en sus hospedadores (Ried, 2004).

2.2 Compuestos antimicrobianos producidos por BAL

Una de las características conocidas de las BAL es que, durante su crecimiento produce sustancias capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Esta cualidad es utilizada para la destrucción de bacterias indeseables o patógenas sobre todo en la fabricación de alimentos. La naturaleza bioquímica y el mecanismo de acción de muchos de estos compuestos no se encuentran caracterizados, sin embargo, es posible señalar que los productos activos no son más que metabolitos excretados por la bacteria, como el ácido láctico o derivados del

metabolismo del oxígeno como el H_2O_2 (Leveau y Bouix, 2000). Las BAL, son capaces de producir otras sustancias antimicrobianas como etanol, CO_2 , diacetilo, acetaldehído, ácido benzoico, isómeros D de aminoácidos, reuterina y bacteriocinas; además de que ciertas cualidades inhibitorias con frecuencia solo se encuentran en medios sólidos. (Piard y Desmazeaud, 1992; Peláez y Requena, 1995; Leveau y Bouix, 2002).

Cabe señalar que los principales mecanismos de antagonismo microbiano que poseen las BAL son la competición por nutrientes y la formación de ácidos láctico y/o acético, aunado al descenso del pH.

2.2.1 Ácidos orgánicos

Durante el proceso de fermentación de los carbohidratos de las BAL se obtienen ácidos orgánicos, principalmente láctico y acético, los cuales no son utilizados por las células bacterianas y son excretados al exterior.

Los niveles y tipos de ácidos orgánicos producidos durante la fermentación dependen de la especie del microorganismo, la composición del medio y las condiciones de crecimiento (Yang, 2000).

El ácido láctico se produce por la vía homofermentativa de las BAL, siendo este el principal metabolito a través de la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), este ácido puede interactuar con las membranas celulares y causar una acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas; aunque también se produce por la vía heterofermentativa, solo que en pequeñas cantidades, junto al ácido acético, etanol y dióxido de carbono. En cuanto a su actividad antimicrobiana, los esteroisómeros del ácido láctico difieren, de forma que el ácido L-láctico es más inhibitorio que el isómero D-láctico (Ouwehand y Vesterlund, 2004; Yang, 2000).

El ácido acético y propiónico son producidos por las cepas BAL mediante la vía heterofermentativa, estos ácidos interactúan con las membranas celulares y causan acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas. Es necesario decir que estos compuestos antimicrobianos son más efectivos que el ácido láctico, esto se debe a los valores elevados de pKa (ácido láctico 3.08, ácido propiónico 4.87 y ácido acético 4.75), por lo tanto, estos ácidos tienen un mayor rango de actividad antimicrobiana contra levaduras, mohos y bacterias (Yang, 2000).

Los ácidos orgánicos presentan un mecanismo de inhibición basado en la disminución del pH del medio, aumentando la proporción de ácidos orgánicos en su forma no disociada. Al poseer una naturaleza lipofílica estos ácidos son capaces de atravesar la membrana celular por difusión pasiva, disociándose en el citoplasma; ejerciendo su efecto inhibitorio interfiriendo en funciones celulares tales como la translocación del sustrato y la fosforilación oxidativa, provocando un bombeo de protones hacia el interior de las células y una posible desestabilización de la membrana; cuando la concentración de protones excede la capacidad tamponadora del citoplasma, comienza a actuar la bomba de protones hasta que la reserva energética de la célula es agotada, es entonces cuando el pH interno de la célula desciende, causando la desnaturalización de proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de la célula (Piard y Desmazeaud, 1992; De Vuyst y Vandamme, 1994; Peláez y Requena, 1995).

Es necesario señalar que las BAL presentan inmunidad a este mecanismo, lo cual les permite sobrevivir y desarrollarse a valores de pH relativamente bajos, ya que poseen un sistema que transporta simultáneamente el ácido láctico y protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, genera energía (Tseng y Montville, 1993).

2.2.2 Diacetilo y Acetaldehído

El diacetilo o 2,3-butanodiona presenta una acción bactericida para las bacterias Gram negativas y bacteriostática para las Gram positivas, esto es debido al grupo alpha dicarbonil de la molécula, la cual reacciona con la porción guanido del aminoácido arginina de las enzimas microbianas, desactivándolas por el bloqueo o modificación de la zona catalítica (Lindgren y Dobrogosz, 1990; De Vuyst y Vandamme 1994). Además de esto, posee actividad inhibitoria, el diacetilo a 344 microgramos/mL puede inhibir cepas de *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Aeromonas* (Ouwehand y Vesterlund, 2004; Yang, 2000).

El acetaldehído es producido por cepas de *Lactobacillus delbrueckii* spp., y *L. bulgaricus* mediante la acción de una treonina aldolasa, la cual transforma la treonina en acetaldehído y glicina. A una concentración entre 10-100 ppm el acetaldehído inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *E. coli* en productos lácteos (Sánchez, 2003).

2.2.3 Peróxido de hidrógeno

Las BAL producen H_2O_2 como un mecanismo de protección frente al oxígeno, mediante la acción de oxidasas o NADH peroxidasas, ya que carecen de una catalasa que elimine el H_2O_2 que se genera, este se acumula en el medio (Adams y Moss, 2008).

La acción inhibitoria del H_2O_2 es atribuida a su efecto altamente oxidante, dando origen a la peroxidación de los lípidos de la membrana y la destrucción de la estructura básica molecular de proteínas celulares (Yang, 2000).

2.2.4 Bacteriocinas

La utilización de las BAL y/o sus metabolitos es algo generalmente aceptado como "naturales" y "promotores de la salud", siendo un ejemplo el uso de las bacteriocinas. Las bacteriocinas son compuestos proteínicos antibacterianos que son producidos por las BAL y comúnmente encontrados en alimentos, estos son péptido bioactivos con efecto bactericida o bacteriostático sobre especies de bacterias sensibles, no afectan al hospedador, son termoestables, algunas soportan $121^\circ C$ durante 15 minutos y resistentes a la acción de muchas proteasas (Ouweland y Vesterlund, 2004; Parra-Huertas, 2010).

Las bacteriocinas comúnmente poseen un estrecho espectro antibacterial; es así, como algunas bacteriocinas producidas por las BAL pueden inhibir el crecimiento de bacterias Grampositivas patógenas, levaduras o especies Gramnegativas (Parra-Huerta, 2010).

Las bacteriocinas, los ácidos orgánicos, el diacetilo, el acetaldehído y el H_2O_2 en la actualidad han sido sometidos a pruebas diversas con el objetivo de comprobar su capacidad antimicrobiana frente a diversas bacterias Gram positivas y negativas, e incluso algunos otros agentes patógenos. En la industria de los alimentos se ha tomado principal interés en el uso y aplicación de estos productos contra bacterias deterioradoras de alimentos y bacterias asociadas a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

2.3 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.

Las enfermedades que se originan por el consumo de alimentos, incluidas las intoxicaciones e infecciones, se consideran patologías producidas por la ingestión accidental, incidental o intencional de alimentos o agua, que a su vez se encuentran contaminados en cantidades suficientes con agentes químicos o microbiológicos, esto debido a la deficiencia en los procesos de elaboración, manipulación, conservación, transporte, distribución o comercialización de los alimentos y agua. Cabe señalar que esta consideración no incluye las reacciones de hipersensibilidad conocidas como "alergias" por ingesta de alimentos.

Si bien se hace referencia a que las ETA incluyen tanto intoxicaciones como infecciones, resulta importante saber diferenciarlas:

Infecciones alimentarias: Se producen por la ingesta de alimentos o agua contaminados con agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus, hongos y/o parásitos.

Intoxicaciones alimentarias: Son las causadas por la ingesta de alimentos o agua contaminados con cantidades suficientes de toxinas elaboradas por proliferación bacteriana o con agentes químicos (metales pesados y otros compuestos orgánicos), los cuales pueden incorporarse de manera accidental, incidental o intencional, en cualquier momento desde su producción hasta su consumo.

Tanto las infecciones como intoxicaciones alimentarias pueden desarrollarse en dos tipos de cuadros clínicos, siendo estos agudos y los crónicos, los cuales presentan las siguientes características:

Cuadro clínico agudo: Presentan una temprana aparición de signos y síntomas como vómito, diarrea, dolor abdominal, cefalea, algunas veces reacciones alérgicas, deshidratación y otras complicaciones que pueden generar incluso la muerte de la persona y se asocian al consumo reciente de un alimento o agua contaminada. Los cuadros clínicos agudos se presentan generalmente en las infecciones alimentarias.

Cuadro clínico crónico: Se ocasiona generalmente por el consumo de alimentos contaminados con sustancias químicas, además de depender de la concentración del agente etiológico, la manipulación, la duración de la exposición y la susceptibilidad de la persona. En este caso el

periodo de aparición de los síntomas generalmente es muy corto. El cuadro crónico se caracteriza porque, además de los síntomas que se presenta en el cuadro agudo, puede aparecer vértigo, sudoración profusa, asfixia, poca coordinación de los movimientos y a veces convulsiones debido a que se puede ver comprometido el sistema nervioso (Secretaría Distrital de Salud, s.f).

2.3.1 Epidemiología

Las ETA predominan en áreas o lugares donde los hábitos higiénico-sanitarios son deficientes y en lugares contaminados por hacinamiento; sin embargo, estas afecciones se pueden presentar en cualquier lugar (Kopper et al., 2009).

Actualmente existen múltiples factores globales y cambios ambientales como la resistencia antimicrobiana, el aumento de la población, grupos poblacionales susceptibles, el incremento en la comercialización internacional de alimentos, la industrialización de los productos alimenticios, la preferencia por la comida rápida y en muchos casos la poca higiene en la elaboración y manipulación de ésta, todos estos factores contribuyen al incremento de la aparición de las ETA en la actualidad (Secretaría Distrital de Salud, s.f).

Las ETA constituyen además uno de los problemas de salud pública más extendidos en el mundo, por lo que es necesario mantener su vigilancia epidemiológica para aplicar medidas oportunas que permitan su control y prevención, además de asegurarse que los alimentos sean inocuos y aptos para el consumo humano (Grupo de vigilancia y control de factores de riesgo y ambiental, 2010).

En la actualidad se han descrito más de 250 tipos de ETA; las más reportadas son las de origen bacteriano, las cuales son causadas por: *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, etc. De estas, las más reconocidas como causantes de ETA son: *Salmonella* spp, *S. aureus* y *E. coli* O157:H7.

Es posible que a largo plazo, algunas de estas enfermedades ocasionen complicaciones graves. *E. coli* O157:H7 puede provocar el síndrome urémico hemolítico y trombocitopenia, *Salmonella* es capaz de ocasionar artritis y septicemia; *L. monocytogenes* puede generar meningitis y aborto, solo por mencionar algunos casos (Puig et al., 2013).

El control de los microorganismos causantes de ETA, por parte de las autoridades sanitarias y de las plantas procesadoras de alimento, depende en cierta medida del método analítico que se utiliza para su detección (Puig et al., 2013).

En la actualidad para el sistema de salud pública, la detección y la investigación de los brotes de ETA constituyen uno de los principales retos, ya que para esto se requiere obtener, de manera oportuna y eficaz, información médica (datos personales del paciente, síntomas, etc.) y analizar los restos de alimentos o de las materias primas empleadas en la elaboración e incluso de las manos de la personas involucradas en la manipulación del alimento (Flores y Herrera, 2005).

Un alto porcentaje de los casos de ETA no pueden asociarse con algún alimento en particular o no es factible identificar al patógeno responsable, debido, fundamentalmente, a que los resultados de los análisis bacteriológicos demoran; asimismo, el vehiculó alimentario implicado ya no se encuentran disponible para su análisis, lo que sugiere la necesidad de establecer métodos rápidos y eficientes de detección del agente causal (Flores y Herrera, 2005).

2.3.2 Reservorio y periodo de incubación

Los reservorios se encuentran determinados por el tipo de microorganismo o agente causante de la enfermedad. Sin embargo, el principal reservorio de estas enfermedades son las personas que manipulan los alimentos, siendo otros potenciales reservorios los roedores, insectos, utensilios de cocina y aguas contaminadas o productos alimenticios de animales enfermos.

El periodo de incubación para estas enfermedades es variable y se encuentra ligado de igual manera al tipo de microorganismo o agente tóxico que produce la enfermedad, además son factores importantes: la susceptibilidad del individuo, la patogenicidad y la virulencia del agente etiológico, la cantidad de microorganismos o toxinas presentes en los alimentos y la cantidad de alimento contaminado ingerido (Secretaría Distrital de Salud, s.f).

Las ETA son sin duda un problema de impacto mundial, las cuales presentan un mayor reto día a día, ya que la resistencia que los patógenos causantes presentan a los antimicrobianos clásicamente utilizados ha aumentado debido a la combinación de múltiples factores; es por eso que actualmente muchos estudios se centran en determinar la sensibilidad antimicrobiana que presentan estos patógenos frente a nuevos compuestos como los que generan las BAL.

2.4 MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

EL estudio de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos tiene como finalidad evaluar la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2000).

2.4.1 Clasificación:

Existen diversos métodos para evaluar la sensibilidad antimicrobiana dividiéndose comúnmente en: métodos de difusión (antibiograma disco-placa), método de épsilon test y los métodos de dilución en agar y caldo (macro y microdilución).

Como se ha mencionado, en la actualidad existe un creciente interés por descubrir, desarrollar y evaluar nuevos compuestos antimicrobianos, los cuales buscan ser obtenidos de otras fuentes diferentes a la farmacológica, es por esto que se ha volcado la atención a la evaluación de la sensibilidad antimicrobiana y a los diferentes ensayos útiles para su determinación. Los ensayos mencionados son bien conocidos y utilizados para este fin; si bien existen otro tipo de bioensayos, los cuales ya sea por los costos, la falta de equipamiento, etc., son realizados con poca frecuencia, aun con el conocimiento de que son capaces de proporcionar resultados rápidos de los efectos del agente antimicrobiano y una mejor comprensión de su impacto en la viabilidad y daño celular infringido al microorganismo evaluado, estos son: concentración mínima inhibitoria por microdilución, método de difusión en agar en pozo y difusión en agar por el método de la doble capa.

2.4.2 Método de microdilución

Para este método se utilizan placas de microtitulación las cuales tiene pocillos en fondo "U" donde cada uno de ellos representa uno de los tubos del método en macrodilución, por lo cual la metodología a seguir resulta similar. Las placas de microdilución con diferentes concentraciones de antimicrobianos se pueden preparar en el propio laboratorio o bien, actualmente pueden ser compradas a diferentes compañías que los suministran congelados, deshidratados o liofilizados (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2000)

En estos métodos los tubos o placas se incubarán a 35°C durante 16 a 20 h, o bajo las condiciones necesarias para casos especiales. Para evitar diferencias de temperatura en la incubación de bloques de placas de microtitulación no se deben apilar más de cuatro o cinco placas, y tras la incubación de las mismas se procede a la lectura de los resultados; la interpretación de los mismo, se facilita tomando como referencia el crecimiento observado en los tubos o pocillos usados como control positivo (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2000)

En cuanto a la correlación de los resultados por lo general, los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) obtenidos mediante microdilución son iguales o una dilución menor a los que se obtienen mediante la macrodilución (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2000).

Este método es más utilizado con respeto a otros ya que ofrece la facilidad de trabajar con cantidades menores de materiales puesto que una sola placa de microtitulación permite realizar múltiples ensayos además, los volúmenes requeridos se reducen radicalmente de varios mililitros a microlitros permitiendo así emplear menos cantidad de las sustancias a analizar. Por otra parte este método es menos susceptible a la contaminación en comparación al método de macrodilución.

2.4.3 Método de difusión en agar en pozo

El método de difusión en agar en pozo es ampliamente utilizado para la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos provenientes de plantas o microorganismos, lo cual resulta favorable porque con él podemos evaluar adecuadamente los extractos obtenidos a partir de la cepa de *L. paracasei* JLM, este método ofrece la facilidad de observar halos de inhibición bien definidos además de que permite analizar volúmenes mayores de extractos o sustancias en comparación con el método de difusión en agar entre otros. Es además similar en procedimiento al método de difusión con disco por lo que la superficie de la placa de agar se inocula con una suspensión de bacterias (estandarizada) sobre toda la superficie. (Balouiri et al., 2016).

Posteriormente se hace un orificio con un diámetro de 6 a 8 mm perforándose asépticamente con una punta o un corcho estéril, una vez hecho el orificio se introduce en el pozo un volumen de

entre 20-100 microlitros del agente antimicrobiano o de la solución del extracto a la concentración que deseamos evaluar (Balouiri et al., 2016).

Posteriormente estas placas son incubadas en las condiciones necesarias para el microorganismo de prueba; de tal manera que el agente antimicrobiano difunde en el medio e inhibe el crecimiento de la cepa microbiana probada.

2.4.4 Difusión en agar por el método de la doble capa.

Este método, también conocido como autobiografía superpuesta puede definirse como un híbrido entre los métodos de difusión en agar y el método de la autobiografía, además de ser aplicable a un amplio espectro de microorganismos lo cual permite evaluar adecuadamente la cepa de *L. paracasei* JLM y las cepas de desafío asociadas a ETA. Éste proporciona zonas de inhibición bien definidas equiparables a las que se obtienen con el método de difusión en agar en pozo, además de no ser sensible a contaminación (Dewanjee et al., 2015).

El ensayo se realiza mediante la pre-inoculación de una placa de agar con la cepa a analizar, seguida de la aplicación de una capa de agar blando que contiene el microorganismo contra la que se va a retar (Maricic y Dawid., 2014).

Para permitir la buena difusión de las cepas bacterianas las placas se ponen a incubación bajo las condiciones de tiempo y temperatura necesarias para cada cepa. Una vez concluido el tiempo de incubación se observan las placas para interpretar los resultados obtenidos.

III. MARCO DE REFERENCIA

Yang, 2000 en su trabajo **Compuestos antimicrobianos y polisacáridos extracelulares producidos por bacterias ácido lácticas: estructuras y propiedades**, hace referencia a que los compuestos orgánicos producidos por las BAL poseen una función antimicrobiana; mediante métodos de cromatografía, separación y purificación identificó en diferentes cepas de BAL compuestos con una actividad antimicrobiana. Sin embargo, también se hace mención de la importancia de los ácidos orgánicos que presentan esta actividad. Con las cepas analizadas demostró, mediante la resonancia magnética nuclear y la espectrofotometría de masas, la producción de un compuesto antimicrobiano el ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico (PCA) o también llamado ácido piroglutámico, el cual tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra diversas bacterias incluidos los géneros: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*.

Señala que en comparación con el ácido láctico, el PCA presenta una actividad antimicrobiana más baja. Por otra parte, retoma la importancia de las BAL como conservadores para la industria alimentaria por la cantidad y variedad de sustancias capaces de producir y que presentan la actividad antimicrobiana tan importante; hace mención de la clasificación de los compuestos de baja y alta masa molecular como el diacetilo y el acetaldehído además de las bacteriocinas.

González Martínez, et al., 2003 en su artículo titulado **Bacteriocinas de probióticos** hacen referencia al uso de los probióticos como sustancias beneficiosas para la microbiota intestinal de los seres humanos, dado que son microorganismos que permiten y favorecen que se lleven a cabo un gran número de reacciones fisiológicas que influyen directa o indirectamente en el buen funcionamiento intestinal. Se menciona que los probióticos favorecen la resistencia contra la invasión de microorganismos patógenos, lo cual logran a través de la generación de sustancias antimicrobianas. Haciendo referencia que la industria alimentaria ha incursionado en el uso de las BAL como bioconservadores debido a la producción de bacteriocinas y demás sustancias que ejercen una acción antibacteriana previniendo la descomposición de alimento. Cita además, que la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas estaba dada contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, pero que en la actualidad este concepto se ha visto modificado pues se han encontrado que presentan acción bactericida contra cepas completamente diferentes a las que las producen.

Larrea et al., 2007 realizaron la **Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I.** En su trabajo los investigadores analizaron seis diferentes BAL sobre cepas de *E. coli*, *S. enteritidis* y *S. dysenteriae*, las cuales son bacterias patógenas del tracto gastrointestinal. Mediante el ensayo de CMI hicieron pruebas a diferentes concentraciones de suspensiones bacterianas de las seis cepas utilizadas; los resultados de estos ensayos revelan diferentes grados de actividad antimicrobiana frente a bacterias entéricas, siendo *L. fermentum* y *L. acidophilus* las cepas que presentaron un mayor efecto bacteriostático frente a *E. coli* y *S. enteritidis* mientras que *L. fermentum* frente a *E. coli* presentó el mayor efecto bactericida. De esta manera se concluyó la utilidad de las BAL en el control de bacterias entéricas gastrointestinales.

Vásquez et al., 2009 en su trabajo **Utilización de sustancias antimicrobianas producidos por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne;** los investigadores hacen mención de la biopreservación de los alimentos cárnicos, este método ofrece extender la vida útil y aumentar la seguridad de los alimentos utilizando las propiedades antibacterianas de las BAL (aisladas de diferentes productos, cárnicos, lácticos, etc.) atribuidas a los productos finales de su metabolismo como el ácido láctico, acético, H₂O₂, diacetaldehído, reuterina y bacteriocinas. Otra de las ventajas de su utilidad mencionadas es que el uso de las BAL como bioconservadores no produce cambios drásticos de las características sensoriales en productos cárnicos en comparación a los que produce en productos lácticos y hortalizas, lo que vuelve aún más atractivo su uso sobre productos cárnicos.

Fernández et al., 2014 realizaron una revisión literaria llamada **Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibitorio de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos. Revisión sistémica de la literatura, 2008-2012** en el cual lograron identificar 125 estudios sobre metabolitos inhibidores y de estos 31 fueron realizados en alimentos. En cuanto a las bacteriocinas y el tipo de microorganismos inhibidos mencionan la obtención de 114 trabajos de los cuales 50 fueron realizados con bacteriocinas producidas por BAL, además de que los microorganismos más frecuentes en los estudios fueron *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Ellos concluyen con esta revisión que los productos lácticos y cárnicos son los más referenciados en estudios con matrices alimentarias y que las bacteriocinas

son los metabolitos más utilizados para inhibir el crecimiento de microorganismo patógenos, además de reducir las ETA.

Bustamante y Alvarado, 2015 en su trabajo **Efecto del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp. sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis***, aislaron a partir de heces de neonatos cepas de *Lactobacillus* sp. probando la capacidad antagónica de 7 de estos cultivos sobre las bacterias patógenas mediante el método de difusión en agar. Los investigadores concluyen que el sobrenadante de los cultivos de *Lactobacillus* sp. aislados presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. enteritidis* y *S. typhi*, pero no sobre el crecimiento de *S. aureus*.

Ruiz et al., 2017 en su trabajo **Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos**, evaluaron la capacidad antimicrobiana de *Lactobacillus* spp. frente a *E. coli* 0157:H7, *Salmonella* spp. y *S. aureus*., obtuvieron 27 cepas de *Lactobacillus* spp. de las cuales el 85,18% presentaron capacidad inhibitoria frente a por lo menos una de las cepas patógenas evaluadas, demostrando que los microorganismos aislados presentan potencial para inactivar a los patógenos implicados en estas enfermedades. Para demostrar esto, hicieron uso de la técnica de "puntura" con la cual observaron zonas de inhibición translucidas considerándolas indicativas de inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas por acción de *Lactobacillus* spp.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las ETA son hoy en día una de las causas más comunes de diversos padecimientos, la mayoría de ellos de tipo gastrointestinal, sin embargo, en muchos casos debido a la falta de atención oportuna o de conocimiento acerca de las mismas, éstas pueden complicarse incluso llevando a la muerte de la persona.

Existen múltiples factores que contribuyen a la aparición de las ETA siendo algunos de estos la falta de medidas higiénicas, la multiresistencia que han generado muchos microorganismos a diversos antimicrobianos, la constante automedicación por parte de la población y la falta de concientización acerca de la importancia en el cuidado y tratamiento de los alimentos por la sociedad en general. Por otra parte, las débiles normativas y procedimientos de calidad en las industrias alimentarias y el crecimiento en la demanda de alimentos no han permitido el control de estas enfermedades en consecuencia es poco probable lograr un avance significativo sin la colaboración y compromiso de todas las partes que se verían involucradas en este cambio.

Ahora bien, como en la mayoría de los cuadros asociados a padecimientos gástricos, la población infantil, los adultos mayores y las personas que se encuentran inmunocomprometidas, representan los sectores poblacionales más afectados; no obstante, la constante adaptación de los microorganismos al medio, y su capacidad para resistir los antimicrobianos convencionales han llevado a que todos los sectores de la población sean blancos potenciales de padecer alguna de estas enfermedades y sus complicaciones. Además de que todas estas situaciones representan un problema mayor en el sector salud ya que los gastos de hospitalización, tratamiento médico y costos de recuperación impactan fuertemente sobre la sociedad.

Es entonces que este trabajo surge como contribución para encontrar posibles soluciones al problema global de las ETA, puesto que se busca promover a futuro el uso de alternativas más favorables y menos contraproducentes como las que nos ofrecen las bacterias ácido lácticas, las cuales nos permitirían disminuir algunas de las causas a tales padecimientos gracias a la producción de múltiples sustancias capaces de inhibir el desarrollo de bacterias causantes de ETA.

¿La cepa de *Lactobacillus paracasei* JLM es capaz de generar fracciones activas que inhiban el desarrollo de bacterias causantes de ETA?

V. JUSTIFICACIÓN

Con la prevalencia de las ETA, la disminución en la eficacia de los antimicrobianos convencionales contra microorganismos que antes se consideraban susceptibles, el estilo de vida de la sociedad actual, además de la integración de la búsqueda de soluciones menos dañinas como el uso de fármacos cada vez más potentes o la aplicación de elementos tóxicos, ha surgido la necesidad de emplear métodos más amigables con la salud y el ambiente en general como una de las vías más importantes y necesarias para el desarrollo de métodos que permitan el control y disminución de los microorganismos causantes de las ETA.

En los últimos años se ha puesto especial interés en las propiedades benéficas de las BAL no solo como probióticos, si no en las que respectan a su capacidad antimicrobiana, además de su uso y aplicación en el sector biotecnológico, ya que su integración como antimicrobiano en diversos sectores, permitiría un avance significativo en el control o incluso decremento en la prevalencia de las ETA, siendo además un método que hasta el momento no ha representado peligro o posibles complicaciones asociadas a su uso.

Es por ello que en este trabajo se determinó la capacidad antimicrobiana de *Lactobacillus paracasei* JLM y de fracciones activas obtenidas de esta frente a cepas patógenas conocidas por provocar cuadros asociados a ETA.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general

Mostrar la capacidad antimicrobiana de una cepa de *Lactobacillus paracasei* JLM contra bacterias causantes de las ETA: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7 ATCC 70092, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae* 01, *V. cholerae* 01 (Inaba), *V. cholerae* 01 (Ogawa), *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *Brucella abortus* S19 y *B. abortus* RB51.

Objetivos específicos

1. Determinar la capacidad inhibitoria de la cepa de *L. paracasei* JLM frente cepas asociadas a ETA ya mencionadas.
2. Evaluar la capacidad antagónica del extracto libre de células generado a partir de la cepa de *L. paracasei* JLM contra cepas asociadas a ETA.
3. Recuperar fracciones activas a partir del extracto libre de células de *L. paracasei* JLM para evaluar su actividad contra las bacterias causantes de ETA
4. Determinar la CMI de cada fracción activa recuperada para inhibir el crecimiento de las bacterias asociadas a ETA.

VII. HIPÓTESIS

Hipótesis nula

La cepa de *L. paracasei* JLM y las “fracciones activas” extraídas a partir de esta no presenta actividad antimicrobiana contra bacterias asociadas a ETA.

Hipótesis alternativa

La cepa de *L. paracasei* JLM y las “fracciones activas” extraídas a partir de esta presenta actividad antimicrobiana contra bacterias asociadas a ETA.

VIII. DISEÑO DEL ESTUDIO

A) Tipo de estudio

Analítico, transversal, descriptivo y observacional.

B) Universo del estudio

- Bacteria ácido láctica: *Lactobacillus paracasei* JLM
- Bacterias causantes de ETA: *E. coli* ATCC 25922, *S. typhi* ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7 ATCC 70092, *L. monocytogenes*, *V. cholerae* 01, *V. cholerae* 01

(Inaba), *V. cholerae* 01 (Ogawa), *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *B. abortus* S19 y *B. abortus* RB51.

C) **Tamaño de muestra**

Extractos libres de células de *L. paracasei* JLM y “fracciones activas” obtenidas a partir de extracciones con diversos solventes orgánicos.

D) **Sede y lugar del estudio**

Laboratorio de microbiología. Facultad de Cs. Químicas, BUAP E)

Criterios de selección

a) **Criterios de inclusión**

- Extracto libre de células estéril y fracciones activas generadas por una cepa de *L. paracasei* JLM que no estén contaminados.

- Cepas asociadas a ETA previamente identificadas por el grupo de trabajo. b) **Criterios de exclusión**

- Extracto libre de células estéril y fracciones activas generadas por una cepa de *L. paracasei* JLM que estén contaminados.

- Cepas bacterianas no identificadas como causantes de ETA.

F) **Recursos humanos**

Directores: MC. Juan Carlos Benítez Serrano, MC. Laura Martínez Pérez.

p.QFB. Mayrena del Carmen Santos Santiago

G) **Recursos financieros**

- Proporcionados por el departamento de Microbiología de la Facultad de Cs. Químicas BUAP y por los directores del trabajo.

H) **Diseño estadístico** No
paramétrico.

IX. MATERIALES Y METODOLOGÍA

- Biológicos (Cepas bacterianas).

<i>Lactobacillus paracasei</i> JLM	<i>Vibrio cholerae</i> 01
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Vibrio cholerae</i> 01 (Inaba)
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 14028,	<i>Vibrio cholerae</i> 01 (Ogawa)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 70092	<i>Brucella abortus</i> S19
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Brucella abortus</i> RB51

9.0 METODOLOGIA

9.1 Cultivo de cepas bacterianas de desafío (asociadas a ETA).

A partir de cepas asociadas a ETA se sembraron placas de AST, AST con NaCl al 1% y ASC según los requerimientos del microorganismo por el método de estría cruzada, una vez hechas las siembras correspondientes se dejaron incubar a 37°C de 24 a 48 h dependiendo el tiempo necesario para permitir el crecimiento de cada uno de los microorganismos a evaluar (**Esquema 2**). Una vez obtenidas colonias puras se procedió a realizar las pruebas de antagonismo pertinentes.

9.2 Preparación del inóculo a la densidad del 0.5 del estándar de MacFarland

A partir de UFC de las distintas cepas de prueba, previamente cultivadas en las placas de agar correspondiente 18-24h a 37°C, se realizó una suspensión bacteriana en solución salina isotónica (SSI) hasta obtener una turbidez equivalente al 0.5 del estándar de MacFarland.

9.3 Evaluación de la actividad inhibitoria de la cepa *L. paracasei* JLM por difusión en agar por el método de doble capa.

Para este ensayo se inoculó 1 µl de cultivo de la cepa de *L. paracasei* (3×10^{10} células) en un pocillo de 1 mm de diámetro previamente generado en placas de agar MRS, las placas se

inocularon a 37°C por 48 horas en condiciones de microaerofilia. Posterior al tiempo de incubación se removieron las bacterias y se agregó una mezcla de 1 mL de suspensión bacteriana (con la cepa de prueba correspondiente, ajustada al 0.5 de MacFarland) y 9 mL agar MüellerHinton semisólido, para generar la segunda capa la cual se dejó gelificar para posteriormente incubarse por 24 horas a 37 °C para su lectura. (**Esquema 3**).

9.4 Obtención de extracto libre de células de *L. paracasei* JLM

A partir de precultivo (24h/37°C/150rpm), se sembró la cepa en 100mL de caldo MRS a una dilución 1:100, el cual se incubó a 37°C/150rpm/48 horas. Después del tiempo de incubación, el cultivo se centrifugó a 4500rpm/4°C/30min recuperando el sobrenadante para determinar su valor de pH, se esterilizó por ultrafiltración con membranas de 0.22 µm y se realizaron las pruebas de antagonismo por difusión en agar.

9.5 Pruebas de antagonismo por el método de difusión en agar en pozo.

Las distintas cepas de prueba se sembraron en AST a 37°C/24h y para obtener UFC las cuales se resuspendieron en solución salina isotónica (SSI) hasta obtener una densidad de 0.5 del estándar de MacFarland. Con las diferentes suspensiones se sembraron placas agar MüellerHinton en a las cuales se les colocaron penicilindros de vidrio para generar pocillos en los cuales se adicionaron 150 µl de la capa de *L. paracasei*. Las placas se incubaron a 37°C/24h para observar los resultados, todos los ensayos de antagonismo se realizaron por triplicado (Esquema

4).

9.6 Concentración del extracto de *L. paracasei* JLM por evaporación a presión reducida.

Para la concentración por evaporación se tomó el extracto de *L. paracasei* obtenido de la forma previamente descrita, una vez obtenido el extracto se concentró por evaporación presión reducida a 65°C utilizando el Rotavapor Digital D402-2, hasta obtener el producto casi seco y la fracción del solvente evaporado. El producto concentrado se rehidrató a un volumen final de 10 mL (10X) con solución buffer de fosfatos (PBS) a pH=7, mientras que el solvente recuperado no recibió ningún tratamiento posterior. Todos los productos se esterilizaron por filtración con

membranas de 0.22µm para evaluar su actividad en ensayos de antagonismo por difusión en agar.

9.7 Pruebas de antagonismo del extracto concentrado de *L. paracasei* JLM sometido a extracciones con distintos disolvente orgánicos.

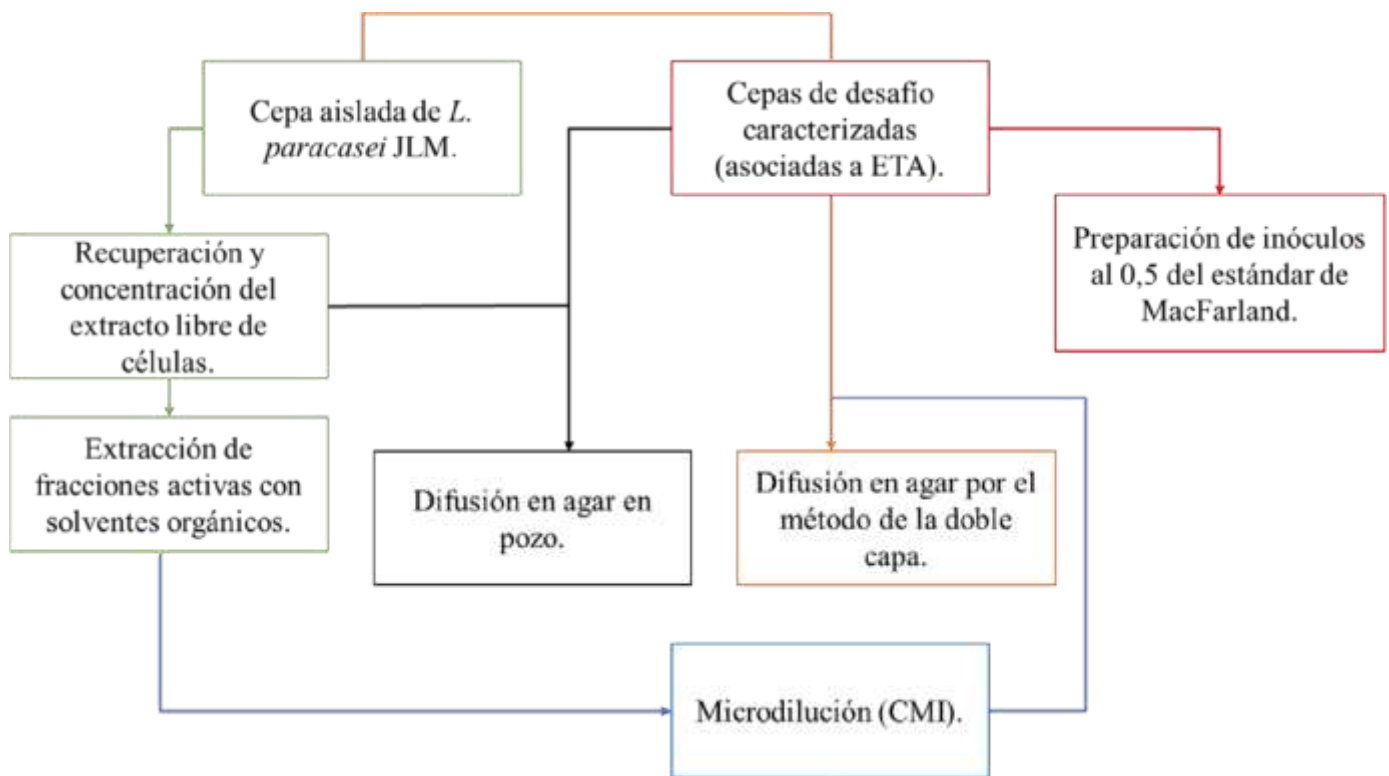
Para este ensayo se utilizaron alícuotas del extracto concentrado de *Lactobacillus paracasei* JLM a los cuales se les adicionaron volúmenes iguales (1:1) de isopropanol, butanol, acetona, acetato de etilo, hexano, cloroformo y éter etílico, respectivamente, para posteriormente centrifugar por 1 minuto a 11000 rpm para romper emulsión, las fracciones orgánicas se separaron y evaporaron hasta obtener el producto seco el cual se resuspendió en H₂O desionizada estéril (Esquema 5) para realizar las pruebas de antagonismo por el método de difusión en agar.

9.8 Prueba de concentración mínima inhibitoria por microdilución.

Bajo condiciones de esterilidad, en una microplaca de 96 pozos con fondo de U se colocaron 50 µL de caldo Müeller Hinton (del pozo 2 al pozo 12). Posteriormente se depositaron 100 µL de una dilución 1:10 de la solución stock del antibiótico (en este caso de las fracciones obtenidas con los disolventes orgánicos) en el pozo 1, de los cuales se tomaron 50 µL para ser transferidos al pozo 2 y a partir de este pozo se realizaron 10 diluciones seriadas dobles a un volumen final de 50 µL (del pozo 2 al pozo 10). Finalmente se adicionaron 50 µL de una dilución 1:150 de un cultivo bacteriano ajustado al 0.5 del estándar de MacFarland a cada uno de los pozos (del 10 al 11), al pozo 12 se le colocaron 50 µL de la dilución 1:10 del antibiótico (los pozos 11 y 12 servirán como controles). Metodología mostrada en el **Esquema 6**. Por último se colocó la tapa a las placas las cuales se incubaron a 37°C por 24 h para su interpretación.

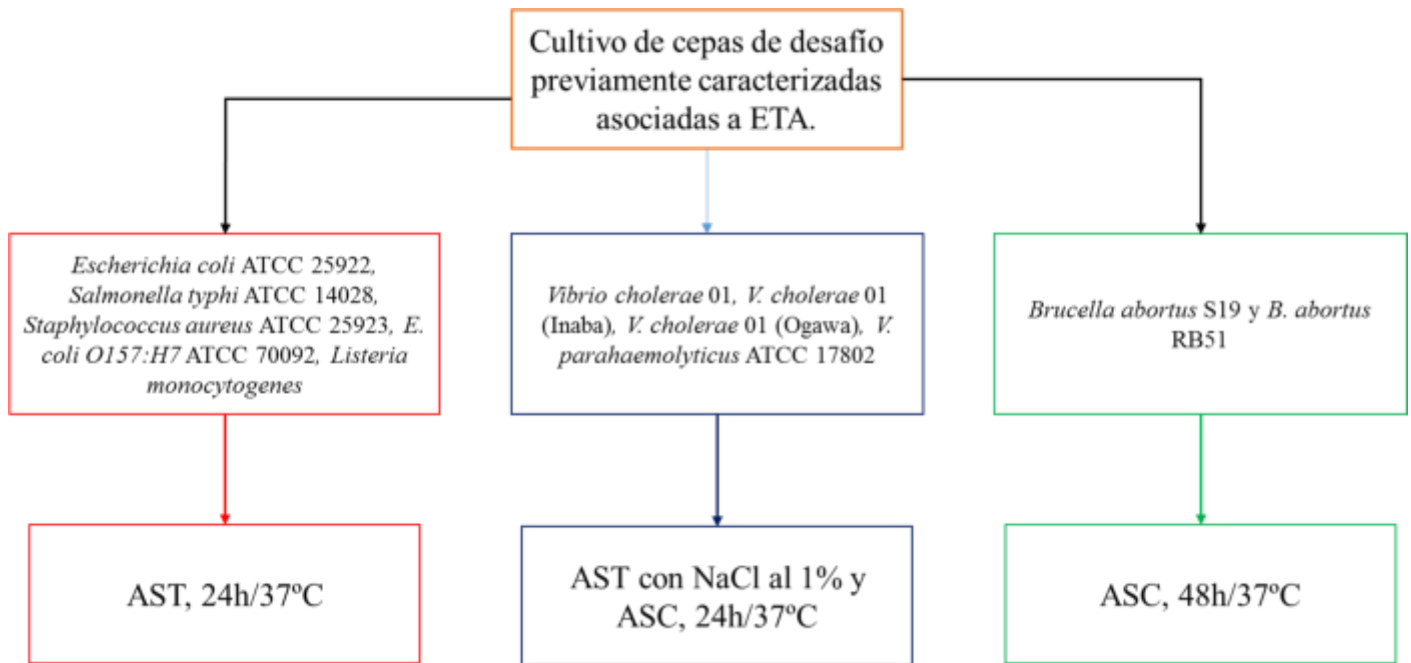
9.9 ESQUEMAS DE TRABAJO

Esquema 1: Esquema general de trabajo.



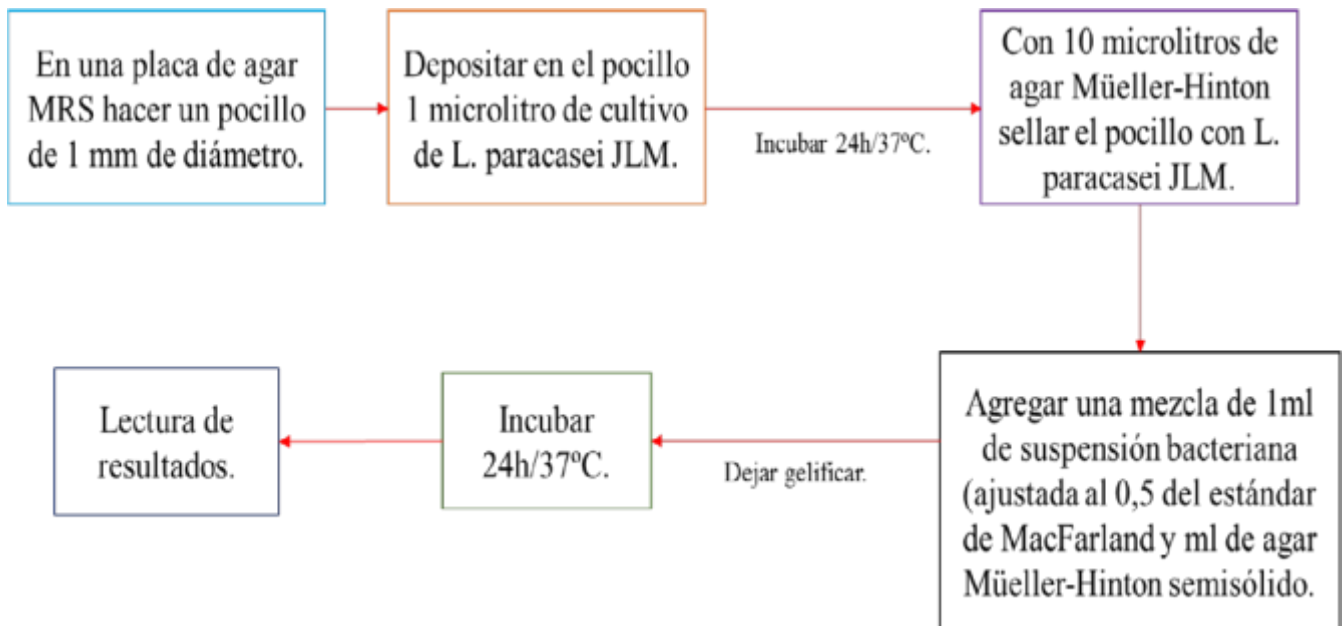
Fuente: Diseño del estudio.

Esquema 2: Cultivo de las cepas de desafío en los medios adecuados para su desarrollo.



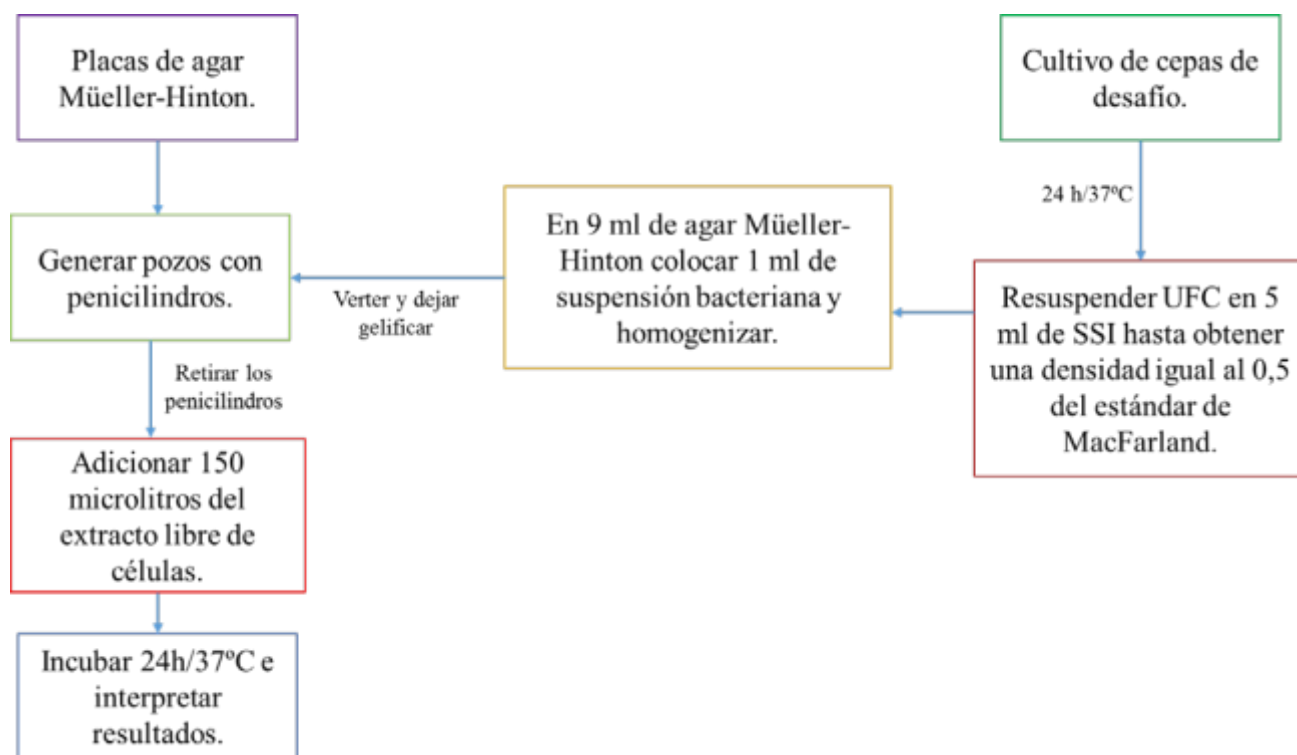
Fuente: Diseño del estudio.

Esquema 3: Ensayo de difusión en agar por el método de la doble capa.



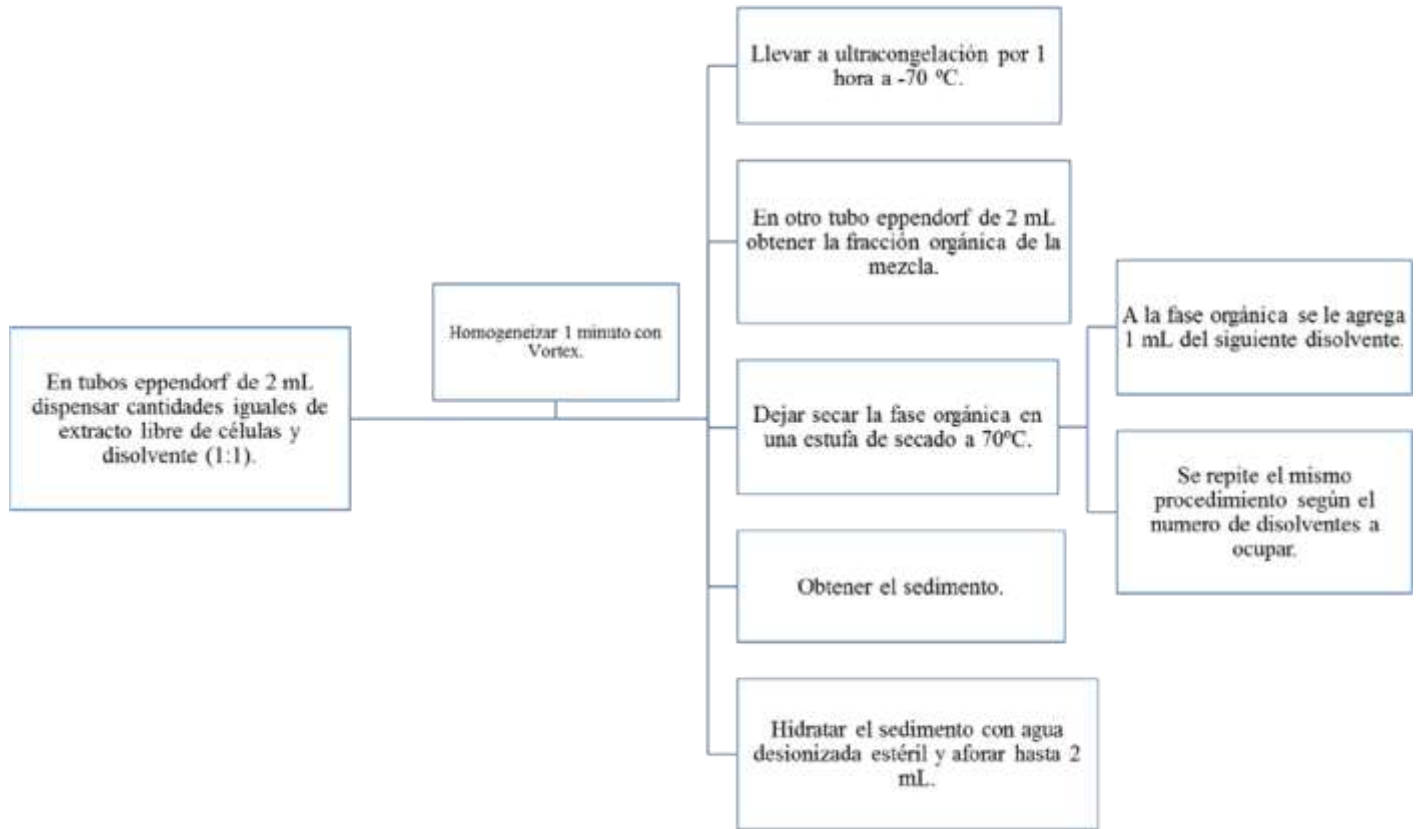
Fuente: Diseño del estudio.

Esquema 4: Ensayo de antagonismo de difusión en agar en pozo.



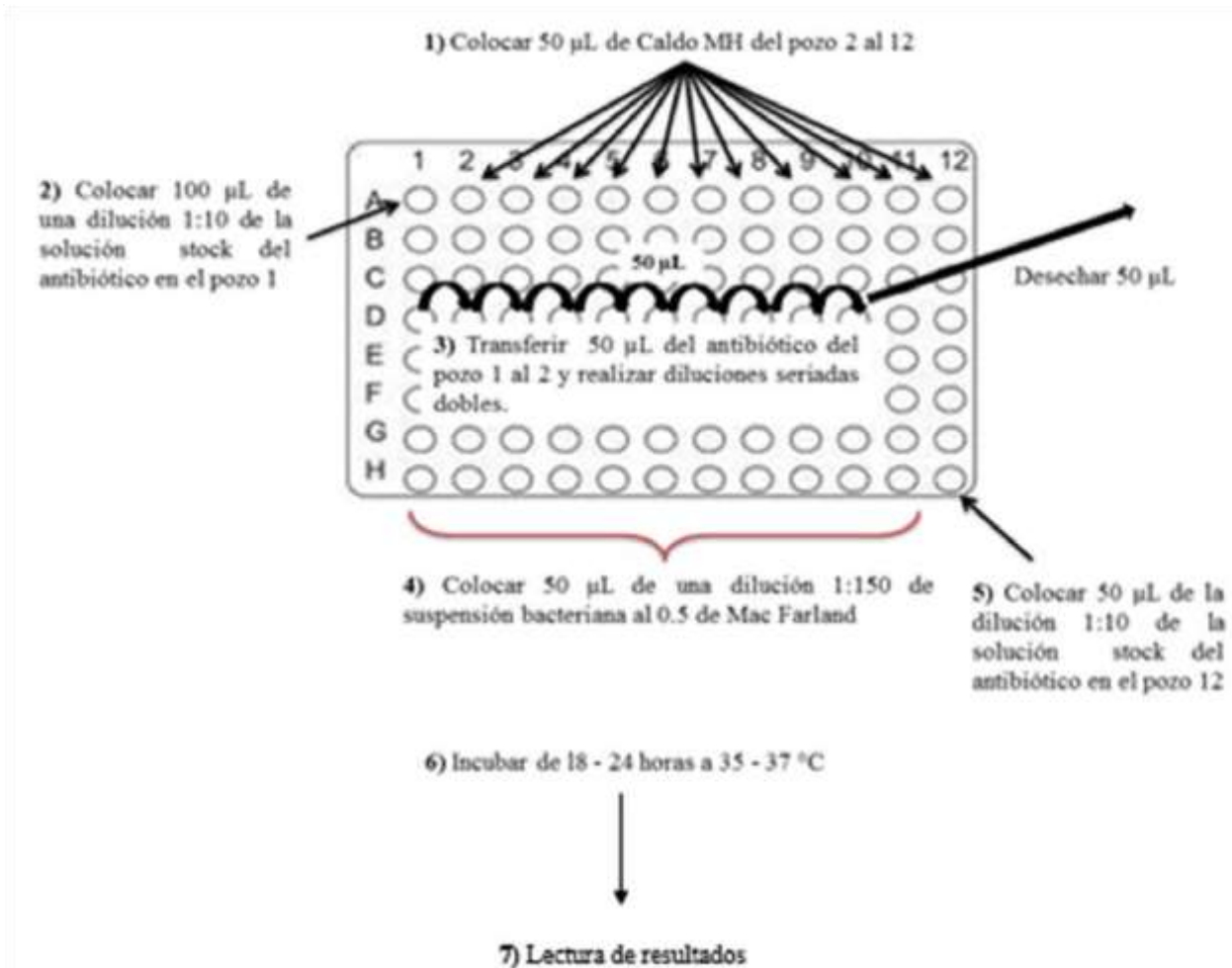
Fuente: Diseño del estudio.

Esquema 5. Obtención de fracciones activas a partir de extracto libre de células mediante extracciones con disolventes orgánicos.



Fuente: Diseño del estudio.

Esquema 6: Ensayo por microdilución (CMI).



Fuente: Diseño del estudio.

X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del extracto libre de células de *L. paracasei* JLM y de *L. paracasei* JLM 10x por el método de difusión en agar en pozo.

En la tabla 1 se evaluó la capacidad antagonista del extracto libre de células a las concentraciones 1x y 10x frente a las cepas de desafío causantes de ETA.

Tabla 1. Pruebas de antagonismo por el método de difusión en agar en pozo del extracto libre de células recuperado de la *L. paracasei* JLM a las 48h. Las concentraciones probadas fueron 1x y 10x frente a las cepas de estudio.

Cepas de referencia asociadas a ETA.	Halos de inhibición (mm)		
	Caldo MRS	E-JLM (1x)	E-JLM (10x)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	---	14	25
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	---	14	26
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	---	---	26
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 70092	---	14	26
<i>L. monocytogenes</i>	---	16	30
<i>V. cholerae</i> O1	---	16	30
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	---	15	29
<i>V. cholerae</i> O1 (Inaba)	---	16	31
<i>V. cholerae</i> O1 (Ogawa)	---	16	34
<i>B. abortus</i> S19	---	17	56
<i>B. abortus</i> RB51	---	17	38

El caldo MRS fue utilizado como control negativo de crecimiento.

Fuente: Resultados de laboratorio.

Después de realizar la incubación por 24h a 37°C, se pudieron observar halos de inhibición bien definidos en casi todas las cepas de desafío (Figura 1), excepto en la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 cuando fue evaluada contra el extracto libre de células 1x, ya que esta no mostró ningún efecto antagónico.

Todas las cepas presentaron un efecto antagónico frente al extracto 10x, además de que los halos de inhibición presentados fueron mucho más amplios. Es probable que el mayor efecto inhibitorio presentado por el extracto 10x sea debido al aumento de moléculas con capacidad antimicrobiana como resultado de realizar una concentración a diez veces del extracto libre de células generado por la cepa de *L. paracasei* JLM.

El amplio espectro inhibitorio presentado por el extracto libre de células a las concentraciones de 1x y 10x son similares a los obtenidos por Mohammadi et al., 2018, donde los investigadores caracterizaron la producción de bacteriocinas generadas por bacterias obtenidas a partir de leche materna, aisladas y evaluadas por el método de difusión en agar en pozo, arrojando 18 cepas de *Lactobacillus* con capacidad antagónica.

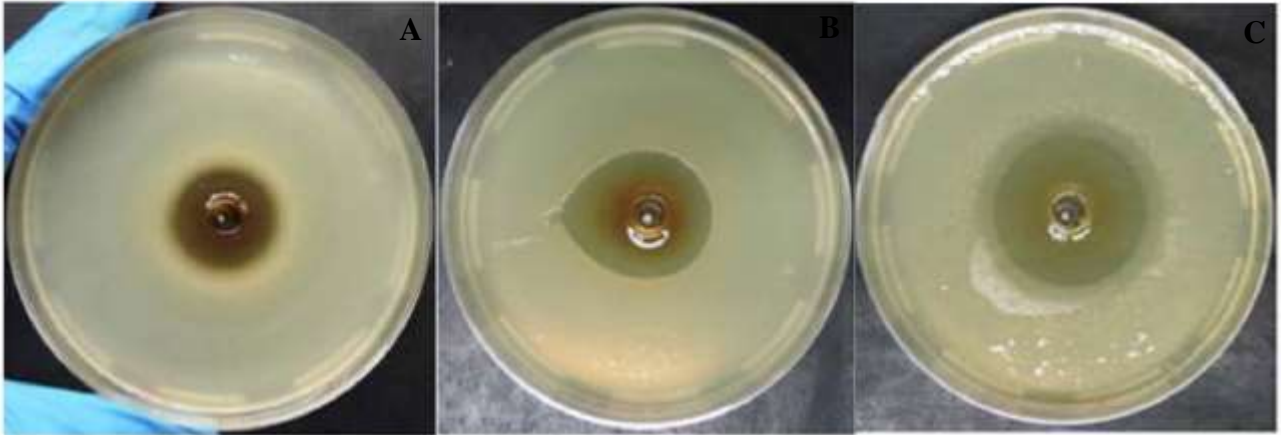


Figura 1. Determinación de la actividad antimicrobiana de *L. paracasei* JLM por ensayos de antagonismo a Cuando se evaluó el extracto concentrado 10x y se comparó con el efecto obtenido con el extracto 1x se observa que el primero presenta un efecto mucho mayor, ya que este es capaz de inhibir el desarrollo de todas las cepas de desafío sin que los compuestos pertenecientes al medio de cultivo MRS intervengan en tal efecto.

través del método de difusión en agar en pozo . A: *E. coli* O157:H7 ATCC70092, B: *V. cholerae* 01 y C: *B. abortus* RB51. **Fuente:** Resultados de laboratorio.

Pruebas de antagonismo de *L. paracasei* JLM frente a cepas bacterianas causantes de ETA mediante ensayo de difusión en agar por el método de la doble capa.

A partir de cultivos frescos de *L. paracasei* JLM y de las cepas de desafío asociadas a ETA se analizó la cualidad de *L. paracasei* JLM para generar compuestos orgánicos con capacidad antimicrobiana en medios sólidos a través del ensayo de difusión en agar por el método de la doble capa (Tabla 2), este ensayo permitió observar zonas de inhibición bien definidas demostrando que la cepa de *L. paracasei* JLM produce sustancias que ejercen un efecto inhibitorio importante (Figura 2).

Tabla 2. Pruebas de capacidad antagónica de *L. paracasei* JLM mediante difusión en agar por el método de la doble capa.

Cepas de referencia asociadas a ETA.	Halos de inhibición (mm)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	33
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	32
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	32
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 70092	32
<i>monocytogenes</i>	27
<i>cholerae</i> O1	Inhibición total
<i>parahaemolyticus</i> ATCC 17802	Inhibición total
<i>cholerae</i> O1 (Inaba)	Inhibición total
<i>cholerae</i> O1 (Ogawa)	Inhibición total
<i>B. abortus</i> S19	Inhibición total
<i>B. abortus</i> RB51	Inhibición total

Fuente: Resultados de laboratorio.

Con los resultados obtenidos en estos ensayos se comprobó la elevada capacidad antimicrobiana de los compuestos generados por *L. paracasei* JLM en medios sólidos, esto demuestra la importancia del medio de cultivo MRS para la producción de estas sustancias; los resultados que se obtuvieron se compararon con los publicados con Dec et al.,2016, cuyo trabajo evaluó el potencial probióticos de 46 aislamientos de *Lactobacillus* donde todos fueron capaces de producir compuestos activos en el medio MRS con propiedades antagónicas contra *C. jejuni* y *C. coli*. Además Yang et al, 2018 realizaron un trabajo sobre la influencia de los medios de cultivo en el crecimiento y la producción de bacteriocinas de las BAL, en éste demostraron que la producción de bacteriocinas en medio MRS es superior a las producidas en el medio Brain Heart Infusion (BHI) comprobando que algunos medios son más adecuados que otros para la producción de sustancias antagónicas.

Al realizar los ensayos con las diferentes cepas del género *Vibrio* se observó la completa inhibición del desarrollo bacteriano; esto probablemente debido a que el género *Vibrio* se desarrolla a un pH alcalino, por lo que al entrar en contacto con *Lactobacillus* el cual es capaz de acidificar el medio de cultivo (por la producción de ácidos orgánicos), su desarrollo fue

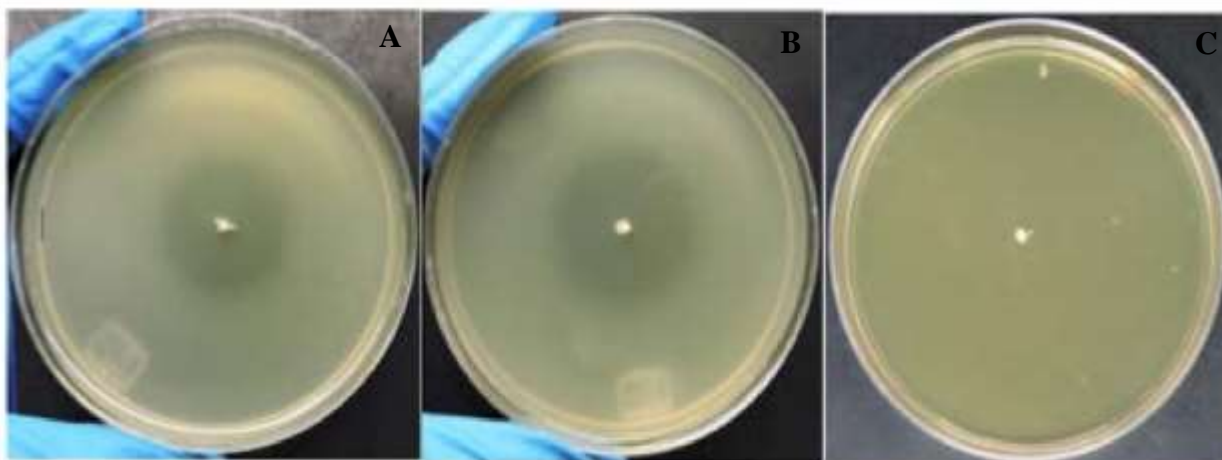


Figura 2. Resultados de los ensayos de antagonismo de *L. paracasei* JLM versus cepas de desafío asociadas inhibido.

En los últimos años han aumentado las referencias sobre el ácido láctico como uno de los principales compuestos orgánicos utilizados por las BAL para generar un efecto inhibitorio, pues al acumularse en el medio ejerce efecto sobre bacterias Grampositivas y negativas penetrando con facilidad la pared celular microbiana (Ramírez et al., 2011) si bien es cierto que este metabolito es producido en el agar MRS, no se ha hecho una cuantificación de la concentración producida del ácido láctico en este medio, por lo que no es posible asegurar si esta concentración tiene una participación importante en el efecto inhibitorio o la falta de este.

a ETA mediante difusón en agar por el metodo de la doble capa. A:*L. monocytogenes*, B: *S. typhi* ATCC 14028 y C: *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. **Fuente:** Resultados de laboratorio.

Evaluación de la capacidad antagonica de las fracciones activas obtenidas a partir del extracto libre de células de *L. paracasei* JLM 10X mediante extracciones con éter etílico, acetato de etilo y acetona por CMI.

Del extracto libre de células de *L. paracasei* JLM 10x, se procedió a obtener “fracciones activas” con solventes orgánicos; de los siete solventes utilizados (isopropanol, butanol, acetona, acetato de etilo, hexano, cloroformo y éter etílico) solo con tres fue posible recuperar estas fracciones (**Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5**), de tal manera que se obtuvieron 19 mg de compuesto con éter etílico, 32 mg con acetato de etilo y 133 mg con acetona, cada uno de estos fueron resuspendidos en 2 mL de agua desionizada estéril para tener así un stock de 9.5 µg/µL para la extracción con éter etílico, 16 µg/µL para acetato de etilo y 66.5 µg/µL para acetona; una vez obtenidos los Stocks se realizaron los ensayos de microdilución para determinar la CMI.

Tabla 3. Evaluación de la capacidad antagonica de la fracción activa del extracto libre de células de *L. paracasei* JLM 10X obtenida con éter etílico por el método de microdilución y determinación de la concentración mínima inhibitoria

Cepas de referencia asociadas a ETA	Concentración (µg)									
	Éter Etílico									
	Diluciones seriadas pares									
	Stock	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
<i>E. coli</i> ATCC 25922	475	237,50	118,75	59,38	29,69	14,84	7,42	3,71	1,86	0,93
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	475	237,50	118,75	59,38	29,69	14,84	7,42	3,71	1,86	0,93
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	475	237,50	118,75	59,38	29,69	14,84	7,42	3,71	1,86	0,93
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 70092	475	237,50	118,75	59,38	29,69	14,84	7,42	3,71	1,86	0,93
<i>L. monocytogenes</i>	475	237,50	118,75	59,38	29,69	14,84	7,42	3,71	1,86	0,93
<i>V. cholerae</i> O1	475	237,50	118,75	59,38	29,69	14,84	7,42	3,71	1,86	0,93
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	475	237,50	118,75	59,38	29,69	14,84	7,42	3,71	1,86	0,93
<i>V. cholerae</i> O1 (Inaba)	475	237,50	118,75	59,38	29,69	14,84	7,42	3,71	1,86	0,93
<i>V. cholerae</i> O1 (Ogawa)	475	237,50	118,75	59,38	29,69	14,84	7,42	3,71	1,86	0,93
<i>B. abortus</i> S19	475	237,50	118,75	59,38	29,69	14,84	7,42	3,71	1,86	0,93
<i>B. abortus</i> RB51	475	237,50	118,75	59,38	29,69	14,84	7,42	3,71	1,86	0,93

Nota: Se partió de una concentración igual a 9.5 µg/µL depositando 100 µl en el primer pozo haciendo disoluciones pares seriadas a volumen final de 50 µl. Con números en negritas se representa la CMI de cada ensayo. **Fuente:** Resultados de laboratorio.

Tabla 4. Evaluación de la capacidad antagonista de la fracción activa del extracto libre de células de *L. paracasei* JLM 10x obtenida con acetato de etilo por el método de microdilución y determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Cepas de referencia asociadas a ETA	Concentración (µg)									
	Acetato de Etilo									
	Diluciones seriadas pares									
	Stock	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
<i>E. coli</i> ATCC 25922	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 70092	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56
<i>L. monocytogenes</i>	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56
<i>V. cholerae</i> O1	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56
<i>V. cholerae</i> O1 (Inaba)	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56
<i>V. cholerae</i> O1 (Ogawa)	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56
<i>B. abortus</i> S19	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56
<i>B. abortus</i> RB51	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56

Nota: Se partió de una concentración igual a 16 µg/µL depositando 100 µl en el primer pozo haciendo disoluciones pares seriadas a volumen final de 50 µl. Con números en negritas se representa la CMI de cada ensayo.

Fuente: Resultados de laboratorio.

Tabla 5. Evaluación de la capacidad antagonica de la fracción activa del extracto libre de células de *L. paracasei* JLM 10x obtenida con acetona mediante el método de microdilución y determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Cepas de referencia asociadas a ETA	Concentración (µg)									
	Acetona									
	Diluciones seriadas pares									
	Stock	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3325	1662,5	831,25	415,63	207,81	103,91	51,95	25,98	12,99	6,49
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	3325	1662,5	831,25	415,63	207,81	103,91	51,95	25,98	12,99	6,49
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3325	1662,5	831,25	415,63	207,81	103,91	51,95	25,98	12,99	6,49
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 70092	3325	1662,5	831,25	415,63	207,81	103,91	51,95	25,98	12,99	6,49
<i>L. monocytogenes</i>	3325	1662,5	831,25	415,63	207,81	103,91	51,95	25,98	12,99	6,49
<i>V. cholerae</i> O1	3325	1662,5	831,25	415,63	207,81	103,91	51,95	25,98	12,99	6,49
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	3325	1662,5	831,25	415,63	207,81	103,91	51,95	25,98	12,99	6,49
<i>V. cholerae</i> O1 (Inaba)	3325	1662,5	831,25	415,63	207,81	103,91	51,95	25,98	12,99	6,49
<i>V. cholerae</i> O1 (Ogawa)	3325	1662,5	831,25	415,63	207,81	103,91	51,95	25,98	12,99	6,49
<i>B. abortus</i> S19	3325	1662,5	831,25	415,63	207,81	103,91	51,95	25,98	12,99	6,49
<i>B. abortus</i> RB51	3325	1662,5	831,25	415,63	207,81	103,91	51,95	25,98	12,99	6,49

Nota: Se partió de una concentración igual a 66,5 µg/µL depositando 100 µl en el primer pozo haciendo diluciones pares seriadas a volumen final de 50 µl. Con números en negritas se representa la CMI de cada ensayo.

Fuente: Resultados de laboratorio.

La fracción activa obtenida con éter etílico es más efectiva contra *B. abortus* S19 puesto que se requiere un concentración igual a 59,38 µg para inhibir su desarrollo, sin embargo, hay que señalar que 6 de las 11 cepas retadas fueron inhibidas a una concentración de 118,7 µg; el principio activo obtenido con acetato de etilo presenta mayor capacidad antagonica a una concentración de 100 µg donde fue inhibido el crecimiento de tres cepas de del género *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *inaba* y *ogawa*) y *B. abortus* RB51, por último la fracción activa obtenida con acetona a una concentración igual a 103,9 µg inhibió el desarrollo de *V. parahaemolyticus* siendo está la mayor capacidad inhibitoria presentada por esta fracción, sin embargo a 207,8 µg

y 415,63 μg presenta una capacidad antagónica similar ergo en ambas concentraciones se inhiben 5 cepas bacterianas causantes de ETA.

Es posible determinar mediante la comparación de las fracciones, que la fracción obtenida con acetona presenta una menor eficiencia antagónica sobre las cepas de desafío, porque requiere la más alta concentración de principio activo (415,63 μg) para inhibir el 45,5% de éstas; en contra posición, con el principio activo obtenido con éter etílico se requiere de una concentración igual a 118,75 mg para inhibir el 54.5% de las cepas de reto, es decir 71.44% menos de principio activo para inhibir más del 50% de las cepas retadas, en cuanto al acetato de etilo es la fracción activa que requiere la mínima concentración para inhibir, sin embargo, con ésta solo se inhibe el 36.36% de las cepas, además de que entre la concentración de éter etílico y la de acetato de etilo solo existen de diferencia 18,75 μg de principio activo.

Los resultados concuerdan con los obtenidos por Larrea et al, 2007, ellos determinaron mediante ensayos de CMI la actividad antimicrobiana de 6 cepas de *Lactobacillus* sobre cepas patógenas de *E. coli.*, *S. enteritidis* y *S. dysenteriae*. En su trabajo demostraron que a una concentración de 4 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ *L. fermentum* y *L. acidophilus* presentaron un mayor efecto bacteriostático frente a *E. coli* y *S. enteritidis*; mientras que a 8 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$, *L. fermentum* presenta un mejor efecto bactericida frente a *E. coli*, permitiendo corroborar que la actividad antimicrobiana de las cepas de *Lactobacillus* tienen un efecto antimicrobiano sobre éstas cepas patógenas.

Najib et al., 2012, identificaron un compuesto esteroideo con actividad antimicrobiana extraído de *Plantago major L* con éter etílico, este compuesto fue probado contra diferentes cepas obteniendo un efecto antagónico frente a *E. coli*; además, Yu et al.,2011 purificaron y caracterizaron compuestos con capacidad antimicrobiana extraídos a partir de *Pseudoalteromonas flavypulchra* utilizando acetato de etilo como solvente, de todas la moléculas el 6- Bromoindo-3-ácido acético y el N-Hidroxybenzoisoxazolona presentaron efectos inhibitorios frente a *S. aureus*; un año más tarde Adane et al., 2013, identificaron a través de la extracción con acetona moléculas con capacidad antimicrobiana tomando las muestras a partir de la madera de raíz de *Moringa stenopetala* donde los cuatro compuestos identificados, coles-5-en-3-ol, ácido palmítico, n-octacosano y el ácido oleico presentaron efecto antimicrobiano frente a *E. coli*.

Es necesario referenciar estos trabajos como un posible inicio para dilucidar los probables compuestos involucrados en el efecto antagónico presentado por las fracciones activas obtenidas a partir de cada solvente, sin embargo, es necesario remarcar que en estos trabajos los compuestos fueron extraídos a partir de plantas y de bacterias marinas Grampositivas, por lo que posiblemente los compuestos obtenidos en ellos varíen en relación a los que nosotros obtuvimos a partir de *L. paracasei*, sin embargo permite tener un primer panorama para su posterior identificación.

XI. CONCLUSIONES.

- 1.- La cepa *L. paracasei* JLM presentó capacidad antimicrobiana contra bacterias causantes de ETA. (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7 ATCC 70092, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae* 01, *V. cholerae* 01 (Inaba), *V. cholerae* 01 (Ogawa), *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *Brucella abortus* S19 y *B. abortus* RB51.)
- 2.- La cepa *L. paracasei* JLM presentó actividad antagónica frente a todas las cepas de desafío asociadas a ETA a través del ensayo de difusión en agar por el método de la doble capa.
- 3.- El extracto libre de células de *L. paracasei* JLM presentó actividad antimicrobiana frente a todas las cepas bacterianas asociadas a ETA.
- 4.- A partir de extracciones realizadas con éter etílico, acetato de etilo y acetona se obtuvieron fracciones activas del extracto libre de células de *L. paracasei* JLM.
- 5.- Se determinó la CMI de cada fracción activa obtenida a partir de la extracción con distintos solventes orgánicos, donde la fracción obtenida con éter etílico presentó el mayor efecto inhibitorio sobre las cepas de desafío asociadas a ETA en comparación con las fracciones obtenidas con acetato de etilo y acetona.

XII. PERSPECTIVAS.

Realizar la identificación de las fracciones activas mediante técnicas de espectroscopia de IR, UV, RMN y de masas para dilucidar las estructuras de los compuestos que permiten la capacidad antimicrobiana de cada uno de ellos.

Optimizar las condiciones para la producción de las fracciones activas que muestran el mayor efecto inhibitorio con el fin de tener mayores cantidades de estas, a un menor costo.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. R., & Moss, M. O. (2008). *Food Microbiology* (3^a ed.). Cambridge, U.K: The Royal Society of Chemistry.
- Adane, L., Tesemma, M., Tariku, Y., Muleta, D., & Demise, S. (2013). Isolation of Compounds from Acetone Extract of Root Wood of *Moringa stenopetala* and Evaluation of their Antibacterial Activities. *Research Journal of Medicinal Plant*, 7(1), 32–47. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2013.32.47>
- Axelsson, L. (2004) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A., Eds., *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 3rd Edition, Marcel Dekker, New York, 1-67. <https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bustamante, G. S., & Alvarado, P. S. (2015). Efecto del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp. sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*. *Revista REBIOLEST*, 1(3). Recuperado de http://www.medicina.usmp.edu.pe/medicina/horizonte/2007_1/Art2_Vol07_N1.pdf
- De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1994). Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, 91–142. https://doi.org/10.1007/978-1-46152668-1_3
- Dec, M., Nowaczek, A., Urban-Chmiel, R., Stępień-Pyśniak, D., & Wernicki, A. (2016). Probiotic potential of *Lactobacillus* isolates of chicken origin with anti-*Campylobacter* activity. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(8), 1195–1203. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0092>
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T. K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>

- Fernández, K. J., Chanci, I. C., Wilches, I., & Cardona, J. A. (2014). Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibitorio de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos. Revisión sistémica de la literatura, 2008-2012.. *Revista Biosalud*, 13(1), 45–61. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v13n1/v13n1a06.pdf>
- Flores, T. G., & Herrera, R. A. R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*, 47(5), 388–390. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342005000500010>
- González Martínez, B. E., Gómez Treviño, M., & Jiménez Salas, Z. (2003). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública y Nutrición*, 4. Recuperado de <http://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/108/92>
- Grupo de vigilancia y control de factores de riesgo y ambiental.. (2010). Protocolo de vigilancia y control de enfermedades transmitidas por alimentos. *Ministerio de Salud y Protección Social* Recuperado de <https://www.minsalud.gov.co/comunicadosPrensa/Documents/ETA.pdf>
- Jay, J. M. (2002). *Microbiología moderna de los alimentos* (4ª ed.). Recuperado de <http://www.proxydgb.buap.mx:2048/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat00046a&AN=buap.b1096437&lang=es&site=eds-live>
- Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT - Food Science and Technology*, 39(10), 1221–1227. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.013>
- Kopper, G., Calderón, G., Scheider, S., & Domínguez, W. (2009). *Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>
- Larrea, H. C., Flores, M. F., & Huapaya, J. Y. (2007). Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I. *Revista Horizonte Médico*, 7(1), 16–22. Recuperado de http://www.medicina.usmp.edu.pe/medicina/horizonte/2007_1/Art2_Vol07_N1.pdf
- Leveau, J. Y., & Bouix, M. (2002). *Microbiología industrial: Los microorganismos de interés industrial*. (2ª ed.). Recuperado de <https://latam.casadellibro.com/libro->

microbiologiaindustrial-los-microorganismos-de-interes-industrial/9788420009209/726464

- Lindgren, S. E., & Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 87(1-2), 149–164. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04885.x>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2004). *Brook. Biología de los Microorganismos*. Madrid, España: Prentice Halle.
- Maricic, N., & Dawid, S. (2014). Using the Overlay Assay to Qualitatively Measure Bacterial Production of and Sensitivity to Pneumococcal Bacteriocins. *Journal of Visualized Experiments*, (91). <https://doi.org/10.3791/51876>
- Marston, A. (2011). Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2676–2683. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.068>
- Martín del Campo, C. I. M., Gómez, H. E. H., & De la O., R. A. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *eGnosis*, 6(5), 1–17. Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/730/73011197005/>
- Mohammadi, F., Eshaghi, M., Razavi, S., Sarokhalil, D. D., Talebi, M., & Pourshafie, M. R. (2018). Characterization of bacteriocin production in *Lactobacillus* spp. isolated from mother's milk. *Microbial Pathogenesis*, 118, 242–246. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.020>
- Najib, A., Alam, G., & Halidin, M. (2012). Isolation and identification of antibacterial compound from diethyl ether extract of *Plantago major* L. *Pharmacognosy Journal*, 4(31), 59–62. <https://doi.org/10.5530/pj.2012.31.11>
- Ouwehand, A., & Vesterlund, S. (2004). Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. *Lactic Acid Bacteria*, <https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch11>
- Parra Huertas, R. A. (2010). Bacterias Ácido Lácticas: Papel Funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8(1), 93–105. Recuperado de

<http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>

Peláez, C., Requena, T. (1995). Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas; *Revista española de ciencia y tecnología de alimentos*, 35, 19-44.

Piard, J. C., & Desmazeaud, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le Lait*, 72(2), 113–142. <https://doi.org/10.1051/lait:199229>

Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2002). Microbiología. (5ª ed.). Recuperado de <https://es.slideshare.net/boscanandrade/libro-lansing-prescott>

Puig, P. Y., Leyva, C. V., Robert, M. B. A., & Pérez, M. Y. (2013). Agentes bacterianos asociados a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en La Habana, 2006-2010. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 51(1), 74–83. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032013000100008

Ramírez, R. J. C., Rosas, P. U., Velázquez, M. Y. G., Ulloa, J. A., & Arce, F. R. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud.. *Fuente*, 2(7), 1–16. Recuperado de <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>

Ried, K. (2004). Gastrointestinal health. The role of pro - ad pre-biotics in standard foods. *Australian Family Physician*, 33(4), 253–255. <https://core.ac.uk/download/pdf/12764930.pdf>

Ruiz, M. J., Colello, R., Padola, N. L., & Etcheverría, A. I. (2017). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 174–177. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.005>

Sánchez, O. I. (2003). Uso del permeado de suero suplementado en la producción de bacteriocinas y su aplicación en la bioconservación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Querétaro. Pp.5-15.

Secretaría Distrital de Salud. (s.f.). *Enfermedades transmitidas por alimentos -ETA-*. Recuperado de

<http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Protocolos%20de%20Vigilancia%20en%20Salud%20Publica/Enfermedades%20Transmitidas%20por%20Alimentos.pdf>

Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>

Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, V. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica.. In Universidad de la República.Facultad de Medicina. Departamento de Bacteriología y Virología. Instituto de Higiene. (Ed.), Temas de bacteriología y virología médica. (2^a ed., pp. 663–671). Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>

Tseng, C. P., & Montville, T. J. (1993). Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: Causes and consequences. *Biotechnology Progress*, 9(2), 113–121. <https://doi.org/10.1021/bp00020a001>

Vásquez, S. M. M., Suárez, H. M., & Zapata, S. B. (2009). Utilización de Sustancias Antimicrobianas Producidas por Bacterias Ácido Lácticas en la Conservación de la Carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1), 64–71. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182009000100007

Walker, C. B., Karpinia, K., & Baehni, P. (2004). Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. *Periodontology* 2000, 36(1), 146–165. <https://doi.org/10.1111/j.16000757.2004.03677.x>

Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>

Yang, Z. (2000). *Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties*. Recuperado de

<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/elint/vk/yang/antimicr.pdf>

Yu, M., Wang, J., Tang, K., Shi, X., Wang, S., Zhu, W., & Zhang, X. (2011). Purification and characterization of antibacterial compounds of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1. *Microbiology*, 158(Pt_3), 835–842. <https://doi.org/10.1099/mic.0.055970-0>