



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS**

**SUSCEPTIBILIDAD DE BACTERIAS ÁCIDO
LÁCTICAS (BAL) FRENTE A DIVERSOS
ANTIBIÓTICOS**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

LICENCIADO EN QUÍMICA EN ALIMENTOS

PRESENTAN

**NANCY MORA PEÑAFLOR
ANDRÉS GARCÍA GUERRERO**

ASESORES

**DRA. ARMIDA ZÚÑIGA ESTRADA
DRA. EVA MARÍA SANTOS LÓPEZ**



PACHUCA DE SOTO, HIDALGO 2007.



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la asesoría de la Dra. Armida Zúñiga Estrada, la Dra. Eva María Santos López y la M. en C. Irais Sánchez Ortega, formando parte del proyecto “Obtención de cultivos iniciadores productores de bacteriocinas de aplicación en la industria láctea” financiado por SAGARPA-CONACYT con clave SAGARPA-2003-144.

Los resultados de éste trabajo de investigación fueron presentados en los siguientes congresos:

- VIII Congreso Nacional de Ciencia de Alimentos y IV Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Monterrey Nuevo León, 2006.
- II Foro de Química en Alimentos. Instalaciones del CEVIDE de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Mineral de la Reforma Hidalgo, 2006.
- 9º Congreso Internacional de Inocuidad de Alimentos y XXIV Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Puerto Vallarta Jalisco, 2007.
- The Second International Workshop on Biotechnology And The Second Internacional Meeting on Alternative Energies. Instalaciones del CEVIDE de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Mineral de la Reforma Hidalgo, 2007.

Dedicatorías

Primeramente a Dios que me dio la oportunidad de vivir, obsequiarme una grandiosa familia y darme la fuerza necesaria para salir adelante en cada tropiezo.

Con amor a mis padres que me dieron la vida, por estar conmigo en todo momento apoyándome y brindándome su cariño.

Con mucho cariño a Tino, porque fuiste, eres y seguirás siendo mi guía y ejemplo a seguir, te quiero mucho.

NANCY...

Agradecimientos

A dios, por todas y cada una de las personas que puso en mi camino.

A mis padres, quienes durante todos estos años confiaron y creyeron en mí.

A mi madre, la mujer que me apoyó todo este tiempo, por su infinito amor, cariño, comprensión y apoyo. Por acompañarme en los buenos y malos momentos, gracias mamá.

A mis hermanos Griss, Jaime, Vero, Tino, Maru, Miguel, Sara y por su puesto a mi cuñadito Tavo por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

A mi hermoso niño que le da luz y sentido a mi vida con esa tierna sonrisa que tiene, te AMO Emilianito.

A la Dra. Valdívía y a su maravilloso equipo, porque sin ellos no sería posible estar aquí culminando este gran sueño, mil gracias!!.

A mis amigos Karina (chaparra), Edi, Angie, Magda, Iris, Analaura, Liz, Maríneth, Miriam, Yuri, Karina (lacia), Vane, Mari, Adrián, J. Antonio, Andrés, Oswaldo, etc., gracias por todo este tiempo juntos en el que pasamos momentos felices, y por que no, también tristes. Gracias por ser mis amigos, nunca los olvidaré.

A mi amigo y compañero de tesis Andrés, gracias por aceptar recorrer este camino juntos, por el entusiasmo y empeño que pusiste para llegar a lograr nuestro objetivo y sobre todo por aguantarme TANTO, TE QUIERO.

A LOS SINODALES POR ACCEDER A SER PARTE DE ESTE TRABAJO, POR SUS COMENTARIOS TAN ACERTADOS PARA ayudar a MEJORARLO, EN ESPECIAL A LA Dra. Armida, a la Dra. Eva y a la M. en C. Iraís, por apoyarnos, tenernos paciencia y confiar en nosotros, gracias!!!

Nancy...

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mis padres Clara y Andrés por el esfuerzo realizado y todo lo que conllevó para que pudiera terminar mi carrera, pero principalmente por el cariño, el amor, el apoyo, la paciencia, etc. etc. Gracias de nuevo, los quiero mucho!!!.

A mis hermanos Víctor Hugo y David, que aunque no he sido el mejor hermano y nunca se los he sabido demostrar pero los quiero mucho.

A las amigas y amigos que he conocido a lo largo de mi vida, por todas las cosas buenas y malas compartidas, así como también a sus familias, por que siempre me han abierto las puertas de su casa. Sólo tengo que decirles que no hago mención de un nombre en específico por que todos son especiales, ya que han sido relevantes y forman parte de las diferentes etapas de mi vida.

A la Dra. Armida, Dra. Eva, M. en C. Irais, Dra. Alicia, Dra. Judith, Dra. Elizabeth, Dra. Angélica, Dr. Javier, Dr. Carlos y a Tina por la amistad y la confianza brindada.

A los sinodales que se dieron el tiempo para revisar esta tesis y hacer sus respectivas observaciones para mejorarla.

A todas aquellas personas que sin conocernos han influido para ser lo que soy. A los libros, las canciones, las revistas, el cine, las traiciones, los enigmas, la cerveza, el humo, el amor, el hambre, el frío, el alcohol, el dinero y demás cosas que seguramente en un futuro me harán ser otra persona.

A Nancy por ser más que una buena compañera de tesis, por las risas y los gritos, por las horas que convivimos y la paciencia que me tuvo durante todo este tiempo; por la gracia, espontaneidad y franqueza de sus comentarios, pero principalmente por ser ella misma.

Andrés García Guerrero.

CONTENIDO

	Páginas
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Bacterias ácido lácticas (BAL)	3
2.1.1. Características generales	4
2.1.2. Metabolismo de los carbohidratos	5
2.1.3. Metabolismo aerobio	9
2.1.3.1. El metabolismo del oxígeno	9
2.1.3.2. Las enzimas del oxígeno y sus derivados	11
2.1.4. Clasificación y géneros representativos de BAL	12
2.1.4.1. <i>Lactobacillus</i>	12
2.1.4.2. <i>Streptococcus</i>	13
2.1.4.3. <i>Carnobacterium</i>	14
2.1.4.4. <i>Pediococcus</i>	15
2.1.4.5. <i>Lactococcus</i>	15
2.1.4.6. <i>Leuconostoc</i>	16
2.1.4.7. <i>Vagococcus</i>	17
2.1.5. Requerimientos nutricionales	17
2.1.5.1. Magnesio	18
2.1.5.2. Manganeso	20
2.1.5.3. Hierro	20
2.1.5.4. Calcio	20
2.1.5.5. Potasio	21
2.1.5.6. Sodio	21
2.1.5.7. Otros iones metálicos	21
2.1.6. Importancia tecnológica de las BAL	22
2.1.6.1. Cultivos iniciadores	22
2.1.6.2. Probióticos	25
2.1.7. Compuestos antimicrobianos producidos por BAL	26
2.1.7.1. Ácidos orgánicos	27
2.1.7.2. Diacetilo y acetaldehído	28
2.1.7.3. Peróxido de hidrógeno	28
2.1.7.4. Bacteriocinas	29
2.1.7.4.1. Modo de acción	30
2.1.8. Antibióticos	31
2.1.8.1. Residuos de antibióticos en leche	32
2.1.8.1.1. Clasificación de residuos de antibióticos según su cinética	33
2.1.8.2. Problemas que plantean los residuos de antibióticos	34
2.1.8.2.1. Problemas tecnológicos	34
2.1.8.2.2. Importancia en la salud pública	35
2.1.8.3. Métodos de detección de residuos de antibióticos	36
2.1.8.4. Mecanismo de acción de los antibióticos ensayados	37
2.1.8.4.1. Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos	38

2.1.8.4.2.	Inhibidores de la síntesis de pared celular	39
2.1.8.4.3.	Inhibidores de la síntesis de proteínas	45
3.	Justificación	55
4.	Objetivos	56
4.1.	Objetivo general	56
4.2.	Objetivos específicos	56
5.	Material y métodos	57
5.1.	Material de uso general	57
5.2.	Equipo de laboratorio	57
5.3.	Reactivos	58
5.4.	Medios de cultivo	58
5.5.	Antibióticos	59
5.5.1.	Preparación de antibióticos	59
5.6.	Material biológico	59
5.6.1.	Cepas de BAL empleadas	59
5.6.2.	Acondicionamiento de las BAL	60
5.6.3.	Pruebas para verificar pureza de las BAL	61
5.6.3.1.	Tinción de Gram	61
5.6.3.2.	Prueba de la catalasa	61
5.6.3.3.	Prueba de la oxidasa	61
5.6.4.	Prueba de susceptibilidad a diversos antibióticos	63
5.6.4.1.	Lectura de los halos de inhibición	63
5.6.4.2.	Análisis de los resultados	63
6.	Resultados y discusión	65
7.	Conclusiones	93
8.	Perspectivas	94
9.	Bibliografía	95
10.	Anexos	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Pag.
1.	Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas	6
2.	Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas	7
3.	Mecanismos de acción de los distintos antibióticos	37
4.	Diagrama de acondicionamiento y pruebas para verificar pureza de BAL	62
5.	Diagrama para la prueba de susceptibilidad de las BAL a diversos antibióticos	64
6.	Distribución por género de las cepas de BAL ensayadas	66
7.	<i>Leuc. Mesenteroides</i> subesp. <i>Mesenteroides</i> 1801, cepa que presentó mayor susceptibilidad frente a amoxicilina con una CMI de 10 µg/mL.	67
8.	Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a amoxicilina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/mL de amoxicilina y se incubaron a 30°C durante 24 h.	69
9.	Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a ampicilina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 30°C durante 24 h.	70
10.	Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a penicilina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/mL de penicilina y se incubaron a 30°C durante 24 h.	73
11.	Cepa más susceptible (a) <i>Lc. raffinolactis</i> 0107 y cepa más resistente (b) <i>Lc. lactis</i> 0103 frente a penicilina con una CMI de 10 µg/mL.	74
12.	<i>Lb. plantarum</i> 0110, única cepa inhibida por fosfomicina con una CMI de 1000 µg/mL.	75
13.	<i>Leuc. Mesenteroides</i> subesp. <i>Mesenteroides</i> 1801 cepa que presentó mayor susceptibilidad a clindamicina.	78
14.	Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a clindamicina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/mL de clindamicina y se incubaron a 30°C durante 24 h.	80
15.	Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a cloranfenicol. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/mL de cloranfenicol y se incubaron a 30°C durante 24 h.	81
16.	Cepa con mayor susceptibilidad (a) <i>Lb. plantarum</i> 0508 y cepa más resistente (b) <i>Lb. plantarum</i> 1509 a la acción de cloranfenicol con una CMI de 100 µg/mL.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Pag.
17.	Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a eritromicina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/mL de eritromicina y se incubaron a 30°C durante 24 h.	83
18.	<i>Lb. plantarum</i> 0110 cepa que presentó mayor susceptibilidad del total de las BAL a eritromicina con una concentración de 10 µg/mL.	84
19.	Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a estreptomina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/mL de estreptomina y se incubaron a 30°C durante 24 h.	86
20.	Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a clortetraciclina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/mL de clortetraciclina y se incubaron a 30°C durante 24 h.	89
21.	Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a tetraciclina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/mL de tetraciclina y se incubaron a 30°C durante 24 h.	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Pag.
1.	Bacterias ácido lácticas homo- y heterofermentativas.	10
2.	Enzimas del metabolismo del oxígeno y sus derivados.	11
3.	Requerimientos nutricionales de algunas bacterias lácticas.	19
4.	Niveles de tolerancia según recomendaciones OMS y FDA.	33
5.	Origen de las BAL empleadas.	60

1. INTRODUCCIÓN

En la industria de los alimentos las bacterias ácido lácticas (BAL) se emplean principalmente como cultivos iniciadores para la elaboración de productos lácteos tales como yogur, leches, mantequillas, quesos madurados, col agria, embutidos (salami y chorizo) y bebidas alcohólicas como la cerveza, sidra entre otros, donde producen cambios específicos en el aroma, sabor, textura, cuerpo, acidez, humedad, digestibilidad y aspecto de los mismos (Hammes y Tichaczek, 1994; Leveau y Bouix, 2000; Doyle y Beuchat, 2007).

La presencia de antibióticos en leche es debido a su uso en el tratamiento de las enfermedades del ganado lechero. La detección de residuos de antibióticos es primordial, ya que independientemente de acciones biológicas (alergias en consumidores, aparición de flora resistente, etc.), tiene repercusiones tecnológicas importantes en la elaboración de productos fermentados (demora en la coagulación, acidificación deficiente, etc.), provocando grandes pérdidas en calidad y, por ende, económicas (Magariños, 2000).

Existen métodos de detección de antibióticos en leche, los de mayor sensibilidad corresponden a técnicas fisicoquímicas, como por ejemplo, la cromatografía de alta resolución (HPLC), electroforesis y métodos inmunológicos. El empleo de estos ha limitado su uso, debido fundamentalmente a sus elevados costos (Cullors, 1992; Keukens y col., 1992; McEwen y col., 1992; Tornadijo y col., 1998).

Existen además métodos microbiológicos, que pueden ser cualitativos y cuantitativos, y se basan en la capacidad de difusión del antibiótico en un medio de cultivo que contiene determinada cepa bacteriana. Éstos tienen la ventaja de poder implementarse fácilmente, poseer bajos costos y otorgar una adecuada confiabilidad, razón por la cual siguen siendo aún métodos de elección en análisis de rutina (Booth y Harding, 1986; Cullors, 1992; Sischo y Burns, 1993).

Por todo lo anterior, las BAL representan una alternativa viable como método de detección de antibióticos, por ello, el objetivo de nuestro estudio fue analizar *in vitro* la susceptibilidad de BAL bacteriocinogénicas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus*, aisladas de quesos artesanales elaborados en el estado de Hidalgo frente antibióticos inhibidores de la síntesis de ADN, pared celular y proteínas, a diversas concentraciones para su posible uso como indicadores de la presencia de residuos de antibióticos.

Por otro lado, las BAL no susceptibles a los diferentes antibióticos podrían ser utilizadas en la manufactura de productos lácteos, sobre todo si hay residuos de antibióticos en la leche como consecuencia de terapia en los animales, ya que puede afectar el desarrollo de las bacterias que se emplean como cultivos iniciadores, lo que podría permitir el desarrollo de bacterias indeseables como *S. aureus* o cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos.

2. ANTECEDENTES

2. 1. Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL fueron descubiertas en 1857 por Louis Pasteur siendo profesor de química y decano de ciencias en la universidad de Lille en Francia mientras realizaba estudios tras la consulta de los vinicultores de la región, de por qué se les descomponía y acidificaba el vino. En pocas semanas descubrió que la substancia que lo alteraba era el ácido láctico, producto de la fermentación láctica desencadenada por ciertos microorganismos. El término "Bacterium acidi lactici" se debe a Weigmamn que lo propuso en 1889 al definir las como bacterias que forman leche ácida a partir del azúcar de la leche (Fernández, 2000; Jay, 2000).

Para el año de 1919 Orla-Jensen elaboró una monografía basándose en:

- 1.- Criterios morfológicos: el grupo estaría constituido por cocos y bacilos Gram positivos, no esporulados e inmóviles.
- 2.- Criterios fisiológicos: microorganismos que al fermentar azúcares forman principalmente ácido láctico, catalasa-negativos, microaerófilos o anaerobios, mesófilos y de requerimientos nutritivos complejos.

Desde el comienzo de la humanidad las BAL han sido empleadas para la fabricación y conservación de alimentos. El descubrimiento de su acción sobre la leche fue probablemente accidental pero su utilización fue perpetuada en forma de cultivos iniciadores, mediante una simple recuperación de una parte del medio de fermentación para promoverla en otros alimentos y bebidas además de que contribuyen a desarrollar sabor y aroma, así como a retardar su deterioro (Gilliland, 1990).

Éstas forman parte de la microbiota natural de muchos alimentos y no existe ninguna indicación de que representen un riesgo para la salud del consumidor, por lo tanto las BAL como algunos de sus metabolitos son considerados como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) de EEUU (Hugas, 1998).

2. 1. 1. Características generales

Las BAL poseen características ecológicas y metabólicas de importancia económica y tecnológica en los alimentos. Su clasificación se basa en la morfología, la forma de fermentar la glucosa, su desarrollo a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad de crecer a altas concentraciones de sal, tolerancia a la alcalinidad y acidez (Axelsson, 2004).

En la actualidad, el grupo de las BAL está conformado por cocos, cocobacilos o bacilos Gram positivos, generalmente inmóviles y no esporulados, catalasa y oxidasa negativas, obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares produciendo ácido láctico como producto principal o único de su metabolismo, carecen de sistemas de transporte de electrones funcionales ligados al heme o de citocromos, y obtienen su energía por fosforilación a nivel del sustrato a la vez que oxidan carbohidratos; no tienen un ciclo de Krebs funcional. Todas estas bacterias son consideradas anaerobias aerotolerantes, y al contrario que las anaerobias estrictas, no son sensibles al oxígeno por lo que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de él. (Madigan y col., 2004).

La mayoría de las BAL son mesófilicas, aunque algunas son capaces de crecer a temperaturas de 5°C y otras a 45°C. Toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias (algunas pueden crecer a pH 3, otras entre 6 y 9, pero la mayoría crece a un pH entre 4 y 4.5) por lo que pueden desplazarlas de los hábitats que colonizan (Jay, 2000).

La catalasa es una enzima que degrada el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), para realizar esta función necesita de un grupo porfirínico (citocromos), el cual las BAL son incapaces de sintetizar y, por tanto, este tipo de bacterias no posee dicha enzima, lo que permite la identificación del grupo como catalasa negativa. En ciertas condiciones, algunas bacterias son capaces de tomar grupos hemo externos para formar una enzima denominada pseudocatalasa. Una característica física debido a la ausencia de citocromos en las BAL es la formación de colonias color blanco lechoso (Prescott y col., 1999).

Tienen posibilidades anabólicas muy limitadas lo que contribuye a reducir el rendimiento de su cultivo y crecimiento formando colonias muy pequeñas. En preparaciones para el microscopio aparecen aisladas o formando cadenas (Walker, 2000).

Son muy exigentes en su nutrición al requerir una gran cantidad de factores nutritivos (aminoácidos, bases nitrogenadas, algunas vitaminas principalmente del grupo B y fuentes de carbono). La mayor parte de las BAL obtienen energía sólo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables, por lo cual su desarrollo está restringido a ambientes ricos en azúcares (Leveau y Bouix, 2000; Madigan y col., 2004).

A pesar de esto, sus hábitats son muy variados, pudiéndoseles encontrar en (Barakat y col., 2000):

- Flora normal de la superficie de material vegetal (frutas y verduras)
- Alimentos fermentados y ricos en azúcares
- Leche y derivados
- Cárnicos
- Mucosas del cuerpo de mamíferos como boca, tracto naso-faríngeo, gastrointestinal y vagina.

2. 1. 2. Metabolismo de los carbohidratos

Una diferencia destacada entre subgrupos de las BAL es la naturaleza de sus productos finales, formados durante la fermentación de los azúcares (Madigan y col., 2004).

Las BAL pueden ser consideradas como homo- o heterofermentativas, dependiendo de como fermenten los azúcares (hexosas y pentosas) en condiciones de crecimiento no limitadas. Las BAL homofermentativas usan la glucólisis vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), resultando el ácido láctico como el producto final (Fig. 1).

Las BAL heterofermentativas usan la vía 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (6-PG/PK) o de las pentosas fosfato produciendo cantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono (CO₂) y etanol (o ácido acético) como productos principales (Fig. 2).

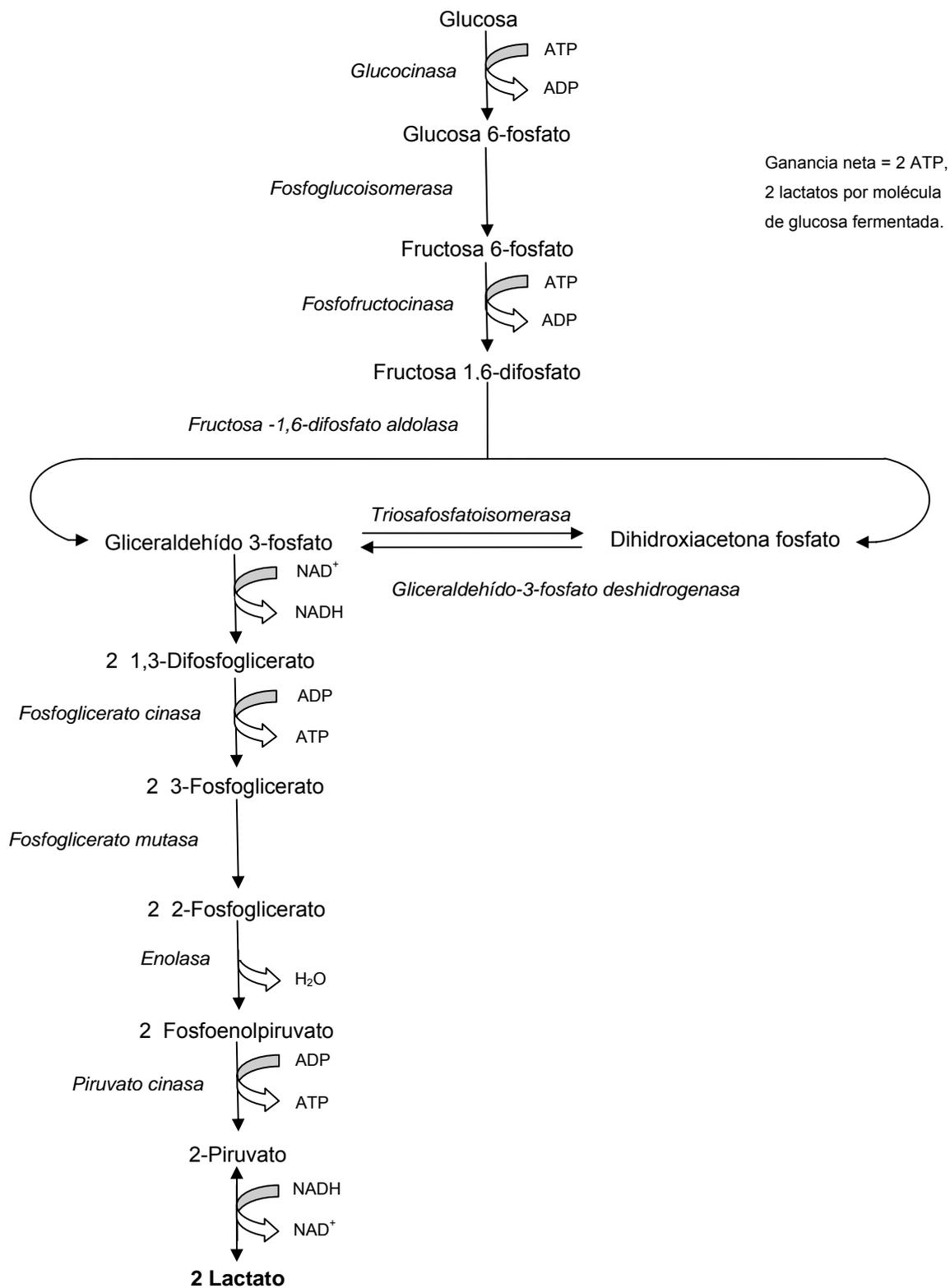


Figura 1. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Adaptada de Axelsson, 2004).

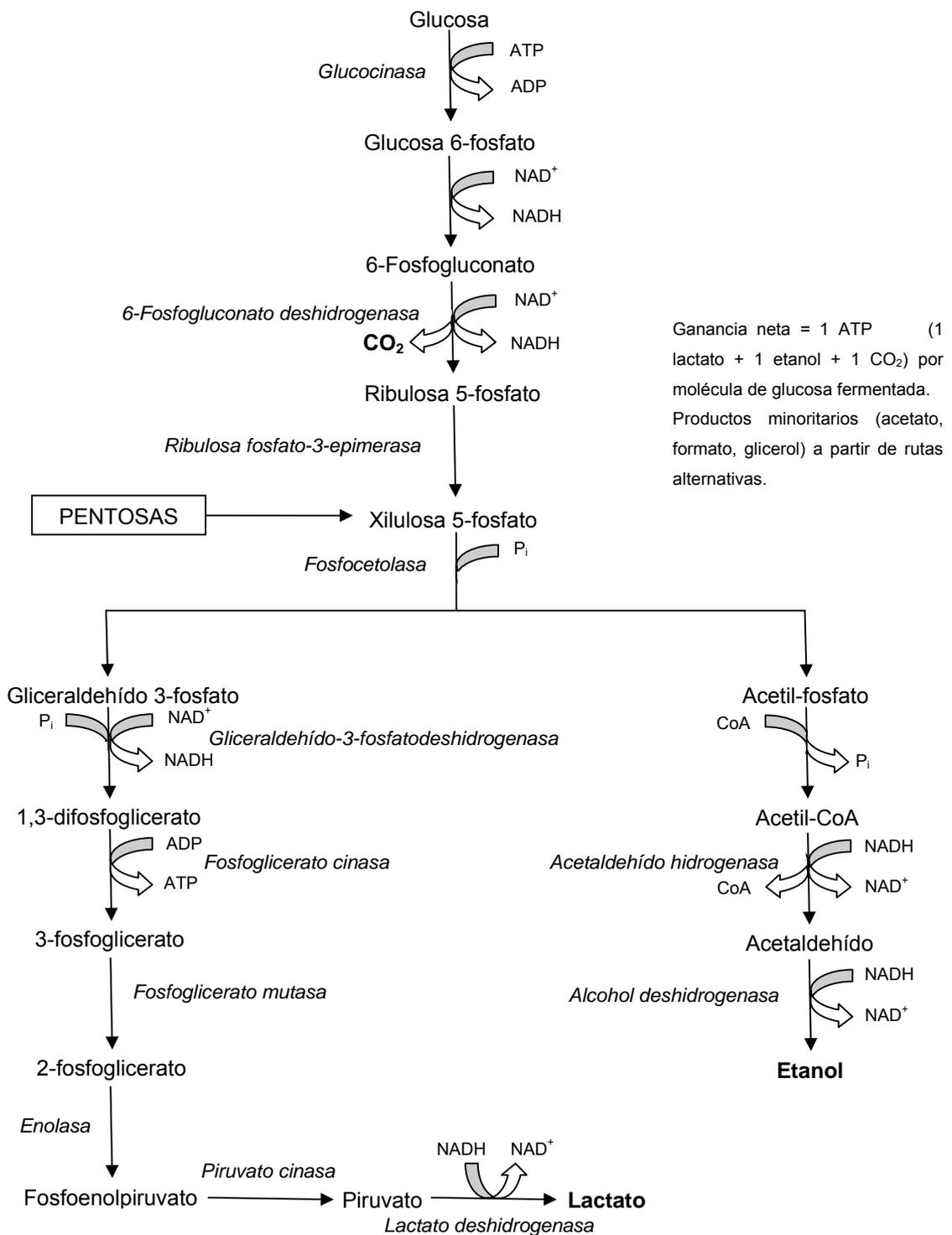


Figura 2. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Adaptada de Axelsson, 2004).

En base a estas dos vías de fermentación, las BAL han sido divididas en tres categorías metabólicas:

- homofermentativas estrictas
- heterofermentativas estrictas
- heterofermentativas facultativas.

Las homofermentativas estrictas sólo pueden fermentar hexosas por la glucólisis, mientras que las heterofermentativas estrictas usan solamente la vía 6-PG/PK y las heterofermentativas facultativas tienen la capacidad de utilizar ambas vías, siendo homofermentativo su metabolismo principal; si se modifican algunas condiciones de cultivo, tales como la concentración de glucosa, pH y la restricción de nutrientes, se induce la vía 6-PG/PK causando la fermentación heteroláctica (Jay, 2000; Axelsson, 2004).

Este cambio no se debe a que el metabolismo de los azúcares derive hacia la vía 6-PG/PK, si no que se refleja un cambio en el modo en que se metaboliza el piruvato: se produce menos lactato y el resto de piruvato se convierte en acetyl-CoA. Bajo condiciones de exceso de nutrientes la concentración de intermediarios catabólicos de los azúcares es elevada y el piruvato se convierte en lactato. Sin embargo, en condiciones limitantes algo de piruvato se metaboliza a etanol y acetato como una adaptación que permite un uso más eficiente que la cantidad limitante de azúcar (Delgadillo y col., 1994).

La diferencia de una vía a otra viene marcada por la presencia o ausencia de la enzima aldolasa, enzima clave en la glucólisis. Las heterofermentativas, carecen de esta aldolasa y no pueden romper la fructosa 1,6-difosfato. En su lugar, oxidan la glucosa 6-fosfato hasta 6-fosfogluconato y después lo descarboxilan hasta xilulosa 5-fosfato que se escinde hasta gliceraldehído 3-fosfato y acetyl-fosfato por medio de la fosfoacetolasa, el gliceraldehído 3-fosfato se convierte en ácido láctico con la producción de una molécula de ATP (Adenosina trifosfato), mientras que el acetyl-fosfato acepta electrones del NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida) que se ha generado

durante la formación de xilulosa 5-fosfato, dando lugar directamente a etanol sin producir ATP. Por ello, las heterofermentativas producen solamente 1 mol de ATP de la glucosa en lugar de 2 como hacen las homofermentativas. Como las heterofermentativas descarboxilan el 6-fosfogluconato, producen CO₂ como producto de fermentación (Prescott y col., 1999).

Para el microorganismo, el producto importante es el ATP, que se usa en multitud de reacciones que requieren energía, y los otros productos de fermentación son meros productos de desecho. Sin embargo, estos últimos no son considerados como tales por los destiladores, cerveceros, productores de derivados lácteos o panaderos. Por todo ello, la fermentación no es sólo un proceso que produce energía, sino un medio para obtener productos naturales que son de utilidad para el consumo humano (Madigan y col., 2004).

Todos los representantes de los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*, junto con algunos lactobacilos, son homofermentativos, mientras que todas las especies *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella*, así como algunos lactobacilos, son heterofermentativos (Tabla 1) (Jay, 2000).

2. 1. 3. Metabolismo aerobio

La relación de las BAL con el oxígeno es compleja: por su incapacidad de sintetizar porfirinas hémicas, son consideradas como anaerobias. Sin embargo, su sensibilidad al oxígeno puede ser muy variable según las cepas: desde anaerobia estricta, aerotolerante e insensible. La ausencia de una catalasa hémica es una característica importante de las BAL, pero bajo ciertas condiciones, algunas bacterias son capaces de tomar grupos hemo externos formando catalasas no hémicas llamadas pseudocatalasas (Prescott y col., 1999).

2. 1. 3. 1. El metabolismo del oxígeno

En general las BAL son capaces de transformar el oxígeno molecular (O₂) en superóxido (O₂[•]), en H₂O₂ o en agua (H₂O).

Tabla 1. Bacterias ácido lácticas homo- y heterofermentativas (Jay, 2000).

Homofermentativas		Heterofermentativas	
Organismos	Configuración lactato	Organismos	Configuración lactato
Lactobacillus		Lactobacillus	
<i>Lb. acidophilus</i>	DL	<i>Lb. brevis</i>	DL
* <i>Lb. alimentarius</i>	L(D)	<i>Lb. buchneri</i>	DL
<i>Lb. bulgaricus</i>	D(-)	<i>Lb. cellobiosus</i>	DL
* <i>Lb. casei</i>	L(+)	<i>Lb. coprophilus</i>	DL
* <i>Lb. coryniformis</i>	DL	<i>Lb. fermentum</i>	DL
* <i>Lb. curvatus</i>	DL	<i>Lb. fructivorans</i>	DL
<i>Lb. delbrueckii</i>	D(-)	<i>Lb. hilgardii</i>	DL
<i>Lb. helveticus</i>	DL	<i>Lb. pontis</i>	DL
<i>Lb. jugurti</i>	DL	<i>Lb. sanfrancisco</i>	DL
<i>Lb. jensenii</i>	D(-)	<i>Lb. trichoides</i>	DL
<i>Lb. lactis</i>	D(-)	Leuconostoc	
<i>Lb. leichmanii</i>	D(-)	<i>Leuc. cremoris</i>	D(-)
* <i>Lb. plantarum</i>	DL	<i>Leuc. dextranicum</i>	D(-)
<i>Lb. salivarius</i>	L(+)	<i>Leuc. lactis</i>	D(-)
Pediococcus		<i>Leuc. mesenteroides</i>	D(-)
* <i>P. acidilactici</i>	DL	<i>Leuc. gelidum</i>	D(-)
<i>P. cerevisiae</i>	DL	<i>Leuc. carnosum</i>	D(-)
* <i>P. pentosaceus</i>	DL	<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>	
* <i>P. damnosus</i>		<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>cremoris</i>	
* <i>P. dextrinicus</i>		<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>dextranicum</i>	
* <i>P. inopinatus</i>		<i>Leuc. argentinum</i>	
<i>P. parvulus</i>		<i>Leuc. citreum</i>	
Tetragenococcus		<i>Leuc. fallax</i>	
<i>T. halophilus</i>	L	<i>Leuc. pseudomesenteroides</i>	
<i>T. muriaticus</i>		Carnobacterium	
Streptococcus		<i>C. divergens</i>	
<i>S. bovis</i>	D(-)	<i>C. mobile</i>	
<i>S. thermophilus</i>	D(-)	<i>C. gallinarum</i>	
Lactococcus		<i>C. piscicola</i>	
<i>Lc. lactis</i>		Weissella	
subesp. <i>lactis</i>		<i>W. confusa</i>	DL
biovar <i>diacetylactis</i>	L(+)	<i>W. hellenica</i>	D(-)
<i>Lc. lactis</i> subesp. <i>cremoris</i>	L(+)	<i>W. halotolerans</i>	DL
<i>Lc. lactis</i> subesp. <i>hordniae</i>		<i>W. kandleri</i>	DL
<i>Lc. garvieae</i>		<i>W. minor</i>	DL
<i>Lc. plantarum</i>		<i>W. paramesenteroides</i>	D(-)
<i>Lc. raffinolactis</i>		<i>W. viridescens</i>	DL
Vagococcus		Oenococcus	
<i>V. fluvialis</i>		<i>O. oeni</i>	DL
<i>V. salmoninarum</i>			

Nota: DL = 25% al 75% del ácido láctico es de la configuración L; D o L = el isómero registrado constituye hasta el 90% o más del ácido láctico; D(L); L(D) = el isómero entre paréntesis representa hasta el 15-20% del ácido láctico total.

*Bacterias heterofermentativas facultativas.

Estas reacciones son catalizadas por enzimas específicas generalmente en presencia de un sustrato a oxidar (Leveau y Bouix, 2000).

2. 1. 3. 2. Las enzimas del oxígeno y sus derivados

El conjunto de las enzimas y sus derivados así como las reacciones catalizadas aparecen en la tabla 2, estas enzimas han sido halladas en cepas de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. En presencia de aire, el peróxido, si no es destruido por una peroxidasa, puede acumularse y autoinhibir la cepa productora, pero sobre todo inhibir cepas concurrentes. Ciertas especies como *Lb. plantarum* no poseen superóxido dismutasa (SOD) y son sin embargo capaces de dismutar el superóxido por acumulación (hasta 20-25 mM) de Mn^{2+} . Este sistema está ausente en los *Streptococcus* y en los *Lactococcus* pero caracteriza a *P. pentosaceus* y a todas las especies de *Lactobacillus* y de *Leuconostoc* que no poseen SOD. Como otras bacterias, las BAL son capaces de reaccionar a concentraciones no letales (0.5 mM) de peróxido induciendo un sistema de resistencia a dosis letales (5 mM). La adquisición de esta resistencia al peróxido está asociada a la de una termorresistencia (Leveau y Bouix, 2000).

Tabla 2. Enzimas del metabolismo del oxígeno y sus derivados (Condon, 1987).

1.	NADH: H₂O₂ oxidasa:	
	$NADH + H^+ + O_2$	\longrightarrow $NAD^+ + H_2O$
2.	NADH: H₂O oxidasa:	
	$2 NADH + 2 H^+ + O_2$	\longrightarrow $2 NAD^+ + 2 H_2O$
3.	Piruvato oxidasa (+ TPP, FAD):	
	Piruvato + fosfato + O ₂	\longrightarrow Acetilfosfato + CO ₂ + H ₂ O ₂
4.	α-glicerofosfato oxidasa:	
	α-glicerofosfato + O ₂	\longrightarrow Dihidroxiacetona fosfato + H ₂ O ₂
5.	Superóxido dismutasa:	
	$2 O_2^- + 2 H^+$	\longrightarrow $H_2O_2 + O_2$
6.	NADH peroxidasa:	
	$NADH + H^+ + H_2O_2$	\longrightarrow $2 H_2O + NAD^+$

TPP: tiamina pirofosfato; FAD: flavina adenina dinucleótido

2. 1. 4. Clasificación y géneros representativos de BAL

El grupo de las BAL está comprendido por aproximadamente 20 géneros. Siendo los siguientes 12 los más representativos (Davidson y col., 1995; Axelsson, 2004):

<i>Carnobacterium</i>	<i>Oenococcus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Tetragenococcus</i>
<i>Lactosphaera</i>	<i>Vagococcus</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Weissella</i>

Aunque el grupo está definido con poca exactitud, todos los representantes comparten la propiedad de producir ácido láctico a partir de las hexosas (Jay, 2000).

Los géneros que a continuación se describen son los de mayor relevancia en la microbiología de los alimentos (Wood y Holzappel, 1995).

2. 1. 4. 1. *Lactobacillus*

Las técnicas taxonómicas que se llegaron a emplear durante la década de los 80's han sido aplicadas a este género, dando como resultado que algunos microorganismos que figuraban en la novena edición del Manual de Bergey's fuesen transferidos a otros géneros. Los lactobacilos tienen forma bacilar, variando desde bacilos largos y delgados a cortos y curvados, no esporulados, aerotolerantes o anaerobios, acidúricos o acidófilos (pH entre 1.0 y 5.0), de requerimientos nutricionales complejos. Es común la producción de bacteriocinas. Los límites de temperatura para desarrollar van de 2 a 53°C con óptima de 30-40°C (Jay, 2000; Madigan y col., 2004).

El género *Lactobacillus* es el más grande, comprendiendo alrededor de 80 especies reconocidas y organizadas en tres grupos, basados principalmente en las características fermentativas. El grupo 1 incluye especies homofermentativas estrictas. El grupo 2 está formado por especies heterofermentativas facultativas. El grupo 3 está formado por especies heterofermentativas estrictas (Jay, 2000; Axelsson, 2004).

Las especies homofermentativas se asocian principalmente con el hombre y animales, ya que se les puede encontrar en la cavidad oral, contenido intestinal y vagina de mamíferos; mientras que las especies heterofermentativas están asociadas con los alimentos, en donde llevan a cabo fermentaciones controladas o causan deterioro especialmente en productos empacados refrigerados, se pueden aislar fácilmente de productos cárnicos, lácteos, pescados, aguas residuales, cerveza, frutas, verduras y ensilados (Madigan y col., 2004).

Generalmente resisten mejor las condiciones de acidez que las restantes bacterias del ácido láctico y pueden crecer bien a valores de pH alrededor de 4 ó 5. Esta propiedad permite su aislamiento selectivo a partir de muestras naturales, empleando medios de cultivo de pH ácido que contengan carbohidratos (Madigan y col., 2004).

Las bacterias del género *Lactobacillus* son indispensables para la industria alimentaria, principalmente la láctea. Se emplean para producir alimentos vegetales fermentados (chucrut, encurtidos, ensilaje, etc.), bebidas (cerveza, vino, zumos), masa agria, queso suizo (así como otros quesos duros), yogur y embutidos. Los lactobacilos causan también problemas, a veces son los responsables de que se deteriore la cerveza, la leche y la carne (Prescott y col., 1999).

2. 1. 4. 2. *Streptococcus*

Son cocos de 0.8-1.2 μm , anaerobios facultativos, se agrupan en cadena hasta con más de 50 células o pares, poseen una considerable actividad SOD. Tienen una compleja necesidad de factores para su crecimiento como: Vitamina B₁, aminoácidos, péptidos, bases púricas y piridínicas. Ésta es una de las razones por las que abundan en un medio rico como la leche (Wood y Holzapfel, 1995).

El género *Streptococcus* contiene una amplia variedad de especies homofermentativas, como productores de ácido láctico juegan un papel muy importante en la producción de leches fermentadas, ensilado y una variedad de productos de fermentación. Los más conocidos son *S. lactis* y *S. cremoris*, los cuales son responsables de la acidificación de la leche, mientras que *S. diacetylactis* produce la fermentación del ácido cítrico a

diacetilo, sustancia característica del aroma en la mantequilla. También es importante *S. thermophilus* que se desarrolla a 40-45°C, por lo que se emplea para conseguir la acidificación del yogur, así como en la maduración de quesos de pasta cocida (Casp y Requena, 1999; Madigan y col., 2004).

De hábitats muy diversos y con actividades de mucha importancia para el ser humano, ya que algunas especies son patógenas primarias de mamíferos. Para distinguir especies patógenas y no patógenas del ser humano se ha reestructurado el género en tres. *Streptococcus*, *Lactococcus*, (estreptococos de importancia en industria láctea) y *Enterococcus* (estreptococos de origen fecal) (Madigan y col., 2004).

2. 1. 4. 3. *Carnobacterium*

Bacilos Gram positivos de 0.5-0.7 x 1.1-3.0 µm; en cultivos viejos se alargan y tienden a perder el Gram, catalasa negativos, psicrótrofos creciendo la mayoría a 0°C, mientras que a 45°C no crecen, metabolismo predominantemente homofermentativo. Algunas especies producen gas a partir de la glucosa. Este género se creó para encuadrar algunos microorganismos anteriormente clasificados como lactobacilos al estar filogenéticamente más próximos a los enterococos y vagococos. Se diferencian de los lactobacilos por ser incapaces de crecer en un medio con acetato y sintetizar ácido oleico. Se encuentran en carnes envasadas al vacío, en carne de aves de corral y en alimentos afines, así como también en pescado y agua de mar (Wood y Holpzafel, 1995).

Carnobacterium como género incluye seis especies (Wood y Holpzafel, 1995; Fernández, 2000):

- *C. divergens* (previamente *Lactobacillus divergens*)
- *C. piscicola* (previamente *Lactobacillus piscicola*)
- *C. alterfunditum*
- *C. funditum*
- *C. gallinarum*
- *C. mobile*.

2. 1. 4. 4. *Pediococcus*

Son cocos Gram positivos, catalasa negativos, anaerobios facultativos. Son homofermentativos, fermentan azúcares para producir una concentración de ácido, comprendida entre el 0.5 y el 0.9%, crecen en salmueras con una concentración salina de hasta 5.5%, mientras que su crecimiento es escaso en salmueras con concentraciones de hasta el 10%. Sus temperaturas de crecimiento oscilan desde los 7 hasta los 45°C, aunque su temperatura óptima está entre 25 y 32°C. Se presentan en parejas o en tetradas como consecuencia de la división celular en dos planos, el tamaño celular varía de 0.6-2.0 µm dependiendo de la especie. Raramente se observan células aisladas. En medios sólidos las colonias son de 1-2.5 mm de diámetro, lisas redondas y de color blanco grisáceo. Necesitan medios complejos para desarrollarse. Se emplean como cultivo iniciador de salchichas semisecas, pueden ser deterioradores de sidra y cerveza realizando una infección que la enturbia y acidifica con un olor peculiar denominado “enfermedad de la cerveza por sarcinas”. Algunas cepas son productoras de bacteriocinas (Wood y Holzapfel, 1995; Fernández, 2000; Jay, 2000).

2. 1. 4. 5. *Lactococcus*

Son cocos no esporulados, inmóviles, crecen a 10°C pero no a 45°C, se encuentran en parejas o cadenas cortas, catalasa negativos, anaerobios facultativos, homofermentativos y con necesidades nutricionales complejas. La longitud de la cadena depende principalmente de la cepa y en ocasiones por el medio de crecimiento. Antiguamente incluidos en el género *Streptococcus*, han sido elevados a la categoría de género, siendo admitidas las cuatro especies y tres subespecies siguientes (Prescott y col., 1999; Jay, 2000):

- *Lc. lactis* subesp. *lactis*
- *Lc. lactis* subesp. *cremoris*
- *Lc. lactis* subesp. *hordniae*
- *Lc. garvieae*
- *Lc. plantarum*
- *Lc. raffinolactis*.

Usualmente crecen en soluciones de NaCl al 4% excepto *Lc. lactis* subesp. *cremoris* la cual únicamente tolera 2% de NaCl (p/v). Se aíslan fácilmente de la leche cruda (*Lc. cremoris*) y de otros hábitats, en particular de los vegetales (*Lc. lactis* subesp. *diacetylactis*), se encuentran también en la flora del rumen (10^4 células por gramo). *Lc. raffinolactis* fue aislado de una leche cuajada, *Lc. garvieae* de una leche mamítica, *Lc. plantarum* de guisantes congelados y *Lc. lactis* subesp. *Hordniae* de una cigarra llamada *Hordnia* (Leveau y Bouix, 2000).

Lactococcus lactis subesp. *lactis* fue aislada por primera vez en 1873 por Joseph Lister en leche fermentada, denominándola *Bacterium lactis* y reconociéndola como agente primario en la acidificación de la leche coagulada; es la BAL más frecuentemente utilizada como cultivo iniciador en la obtención de productos lácteos cultivados, en particular quesos y leches diversas (Leveau y Bouix, 2000).

Siendo las especies *Lc. lactis* subesp. *lactis* y *cremoris* las más estudiadas por su capacidad de producir y excretar una familia de pequeños polipéptidos de 3.500 Da, frecuentemente en forma de dímeros o de tetrámeros considerados antibióticos. Estos polipéptidos reciben el nombre de nisina (por: N estreptococci inhibiting substance) y diplococina respectivamente. Su modo de acción se restringe a bacterias Gram positivas, actúa también sobre células vegetativas impidiendo la germinación de las esporas de bacterias como *Bacillus* y *Clostridium*. La nisina inhibe también a las BAL, por ejemplo a otras cepas de *Lc. lactis* en particular de la subespecie *cremoris*. Por el contrario no muestra actividad contra los lactobacilos y contra *S. thermophilus*. Este compuesto derivado de las BAL es el único que está comercializado y autorizado en la industria agro-alimentaria para la conservación de los alimentos, en particular para la transformación de la leche en Europa. Alternativamente, se puede también considerar la utilización de fermentos que contengan cepas productoras de nisina (Leveau y Bouix, 2000).

2. 1. 4. 6. *Leuconostoc*

Son cocos Gram positivos, catalasa negativos, anaerobios facultativos, pueden ser alargados o elípticos y dispuestos en parejas o cadenas, heterofermentativos,

temperatura óptima de crecimiento de 20 a 30°C. Pueden aislarse de plantas, ensilados y leche. Muy utilizados en la industria láctea (en la manufactura del suero de la leche, mantequilla y queso) como cultivos iniciadores, ya que producen compuestos responsables del sabor como diacetilo o acetoína (productos de la ruptura metabólica del citrato), en la fermentación de verduras como las coles (chucrut) y pepinillos en vinagre. *Leuc. Oenos* es la única especie acidófila del género, siendo importante en la producción de vinos. *Leuc. mesenteroides* produce grandes cantidades de polisacárido de dextrano cuando se cultiva en sacarosa, el cual ha encontrado su uso como sustituto de plasma para transfusiones de sangre. Se puede suponer que los leuconostocs se encuentran en los mismos tipos de alimentos que los lactobacilos, aunque su presencia en alimentos envasados al vacío no es tan constante. Las especies de *Leuconostoc* están implicadas en el deterioro de los alimentos, toleran concentraciones elevadas de azúcar lo que facilita su multiplicación en el jarabe, constituyendo un importante problema en las refinerías de azúcar (Prescott y col., 1999; Jay, 2000; Madigan y col., 2004).

2. 1. 4. 7. *Vagococcus*

En base a los datos de la secuencia del ARNr (ácido ribonucleico ribosomal) de 16S, este género fue creado para encuadrar a los lactococcos. Son móviles por medio de flagelos peritricos, Gram positivos, catalasa negativos, y crecen a 10 pero no a 45°C. Se desarrollan en medios con una concentración de NaCl del 4%, pero no a 6.5%, y a pH 9.6 no existe crecimiento. Se encuentran en heces, pescado, agua y otros alimentos. Al menos una especie produce H₂S (Jay, 2000).

2. 1. 5. Requerimientos nutricionales

Las BAL se asocian a hábitats ricos en nutrientes, como son diversos productos alimenticios tales como leche, carne, bebidas, granos y vegetales, aunque también a la superficie de las mucosas de animales (Barakat y col., 2000).

Siendo muy exigentes en cuanto a su nutrición, todas fermentan glucosa aunque hay algunas que pueden multiplicarse en ausencia de azúcares como es el caso de *Leuc. citrovorum* el cual puede desarrollarse en presencia de citrato como única fuente de

carbono. Mientras algunas no fermentan la sacarosa, otras no atacan la lactosa, las pentosas o las dextrinas. Requieren aminoácidos como fuente de nitrógeno, siendo las sales amoniacales las que estimulan su desarrollo y una diversidad de factores de crecimiento. Esta demanda de determinados nutrientes permite diferenciar algunas especies (Stamer, 1979; Leveau y Bouix, 2000).

A pesar de la utilidad que tienen las BAL para la industria de los alimentos, es reconocida la dificultad que representa el cultivarlas por la necesidad de una gran cantidad de requerimientos nutricionales (Tabla 3). Las vitaminas son los factores de crecimiento que se necesitan con mayor frecuencia, ya que funcionan formando parte de coenzimas. Algunos géneros como *Streptococcus* y *Lactobacillus*, destacan por sus requerimientos vitamínicos complejos, mucho más amplios que los humanos. Las principales vitaminas requeridas por los microorganismos son tiamina (vitamina B₁), biotina, piridoxina (vitamina B₆) y cobalamina (vitamina B₁₂), de aquí su uso en las pruebas microbiológicas para detectar estos compuestos (Madigan y col., 2004).

Las exigencias nutricionales de las BAL a minerales son poco conocidas. En el año 1977 Ledesma y De Ruíz subrayan la necesidad de Mn²⁺ y/o de Fe²⁺ para un buen medio de crecimiento. La necesidad de los iones en el metabolismo se explica en primer lugar por su función de cofactor para numerosas enzimas. Una revisión realizada por Boyaval (1989) menciona la importancia de los minerales metálicos en el metabolismo de las bacterias lácticas.

2. 1. 5. 1. Magnesio

Estimula el crecimiento de las BAL y la producción de ácido láctico: por ejemplo en *Lc. lactis*, *S. thermophilus* y *Lb. acidophilus*. Este elemento es indispensable para numerosas enzimas necesarias para el crecimiento celular o para la producción de aromas. Sería importante para la supervivencia de los *Lc. lactis* (Thomas y Batt, 1968; Amozou y col., 1985).

Tabla 3. Requerimientos nutricionales de algunas bacterias lácticas (Marshall y Law, 1984; Thomas y Pritchard, 1987).

Metabolitos	Exigencias para crecimiento					
	<i>Lc. lactis</i> subesp. <i>lactis</i>	<i>Lc. lactics</i> subesp. <i>diacetylactics</i>	<i>Lc. lactics</i> subesp. <i>cremoris</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leuc.</i> <i>cremoris</i>
Aminoácidos						
Asp	-	-	-	+	+	?
Thr	-	-	-	?	?	?
Ser	-	?	+/-	?	?	+/-
Glu	+	+	+	+/-	+	?
Gly	-	?	+/-	?	?	?
Pro	-	?	+	?	?	?
Ala	-	?	+/-	?	?	+/-
Cys	S	S	+	+	S	+
Val	+	+	+	+	+	+/-
Met	+	+	+	+/-	+	+/-
Ile	+	+	+	+/-	+	+/-
Leu	+	+	+	+	+	+
Tyr	?	?	?	+/-	+	¿?
Phe	+/-	?	+	?	?	+/-
Lys	-	-	+/-	+	+	+/-
His	+	+	+	+	+	?
Trp	?	+/-	?	?	?	?
Arg	+/-	+/-	+/-	?	?	?
Vitaminas						
B ₁₂	+	+	+	+	+	?
Biotina	+	+	+	+	+	?
Nicotiamida	+	+	+	+	+	+
Pantotenato	+	+	+	+	+	+
Riboflavina	+	+	+	+	+	+
Tiamina	+	+	+	+	-	+
Piridoxal	+	+	+	+	-	+
Ácido fólico	+	+	+	+	-	+
Ácidos orgánicos						
Ácido acético	+	+	+	?	?	?
Ácido oleico	+	+	+	?	S	?
Ácido orótico	?	?	?	?	S	?
Ácido fórmico	?	?	?	?	S	?
Bases nucleicas						
Hipoxantina	S	-	-	?	-	+
Adenina	S	S	-	?	S	+
Guanina	S	-	-	?	S	+
Timina	S	-	-	?	-	-
Timidina	S	-	-	?	-	-
Uracilo	S	-	-	?	S	+

Asp= Ácido aspártico, Thr= Treonina, Ser= Serina, Glu= Ácido glutámico, Gly= Glicina, Pro= Prolina, Ala= Alanina, Cys= Cisteína, Val=Valina, Met= Metionina, Ile= Isoleucina, Leu= Leucina, Tyr= Tirosina, Phe= Fenilalanina, Lys= Lisina, His= Histidina, Trp= triptófano, Arg= Arginina.

2. 1. 5. 2. Manganeso

Muy concentrado por *Lb. plantarum*, el manganeso sirve para la resistencia de esta especie al superóxido (O_2^-). La presencia de Mn^{2+} en extractos vegetales explica la estimulación del crecimiento de las BAL por estos medios. Diversas especies de *Leuconostoc* y todos los *Lactobacillus* exigen Mn^{2+} y la variación estacional de este catión en la leche explicaría la variación del crecimiento y la producción de aromas por parte de *Leuc. cremoris* (Boyaval, 1989).

El Mn^{2+} es necesario para la actividad de numerosas enzimas entre las cuales se encuentran la ARN polimerasa, la lactato deshidrogenasa (LDH), la enzima maloláctica, la NADH oxidasa, una SOD y una catalasa formada por crecimiento de hematina de lactobacilos o de pediococos (Johnston y Delwiche, 1965; Archibald, 1986).

2. 1. 5. 3. Hierro

El hierro transportado por varias moléculas muy afines no tiene efecto general sobre el crecimiento o sobre la producción del ácido láctico. *Lb. plantarum* no exige hierro y no lo acumula, lo que le permitiría evitar la formación de radicales libres tóxicos a partir del oxígeno y ser resistente a una alta concentración (7 mM) de peróxido (Boyaval, 1989).

2. 1. 5. 4. Calcio

Normalmente excluido de las células bacterianas, el calcio se acumula en las células de *Lc. lactis* en fase exponencial y se estabiliza (10^3 mM) en la fase estacionaria. No estimula el crecimiento de las BAL salvo el de *Lb. casei* y permite la desintegración de las cadenas de células así como una modificación de su forma en *Lb. acidophilus* que le permite una mejor resistencia a la congelación. El calcio se cita con frecuencia por su papel en la pared celular en particular para la actividad de las proteasas. Esta propiedad es atribuída por los autores ya sea a la fijación de la enzima sobre la pared, a la estabilidad de su actividad, y/o a la modificación de la estructura de la pared. El lactato formado durante la fermentación láctica se excreta acoplado con dos protones. En el momento de este flujo de lactato, hay formación de ATP por una ATPasa membranal dependiente del Ca^{2+}/Mn^{2+} (Konings y Otto, 1983).

2. 1. 5. 5. Potasio

Su transporte es necesario para la regulación del pH intracelular. Es acumulado por *Lc. lactis* y a ésta acumulación le suministra energía la presencia de glucosa o de arginina probablemente en intercambio de protones. Su concentración intracelular es alta y se exige para el crecimiento de *Ec. faecalis*, *Lb. helveticus* y de *Lb. casei*. Otros iones monovalentes (Na^+ , NH_4^+) entran en competencia con el K^+ (Boyaval, 1989).

2. 1. 5. 6. Sodio

Las BAL resisten concentraciones variables de NaCl. Se han aislado cepas resistentes de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* en leches crudas saladas (120 g/L) o de quesos salados como el Domiati egipcio. Una cepa de *Lb. acidophilus* resistente a una elevada concentración de NaCl (1.8 mM, es decir más de 100 g/L), acumula betaína para regular su molaridad (Hutkins y col., 1987).

2. 1. 5. 7. Otros iones metálicos

El **cadmio** contaminante de la leche a baja concentración ($6 \cdot 10^{-5}$ mM) puede inhibir el crecimiento y la producción de ácido de *Lb. delbrueckii* subesp. *lactis*, *Lb. helveticus* y de *S. thermophilus* en este medio (Korkeala y col., 1984).

El **cesio** es inhibidor del crecimiento de *Lb. arabinosus* a partir de 2.25 mM (Boyaval, 1989).

El **cobre** inhibe el crecimiento de las BAL (*Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*) en la leche y la producción de ácido láctico a concentraciones entre 10^2 y 10^{-4} mM según las especies (Boyaval, 1989).

El Cu^{2+} (pero también el Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} y Mo^{6+}) aumentan la producción de diacetilo (Kaneko y col., 1987).

El **cobalto**, parte integral de la vitamina B₁₂ es exigido por algunas cepas de *Bifidobacterium* pero no lo es por *Lb. arabinosus* ni por *Lb. delbrueckii* (Leveau y Bouix, 2000).

Boyaval (1989) menciona que todos estos elementos pueden ser fijados por proteínas o por otras macromoléculas y no estar disponibles para las BAL. Por ejemplo, en la leche cerca del 95% del magnesio y del zinc está ligado a la caseína (Brulé y Fauquant, 1982).

2. 1. 6. Importancia tecnológica de las BAL

Las BAL son empleadas para la fabricación y conservación de alimentos, a pesar de su importancia económica, no siempre han recibido la atención necesaria por parte de los microbiólogos ni del sector industrial. Desde hace algunos años se han convertido en un sujeto de estudio privilegiado en el mundo. Le han sido dedicadas, totalmente o en parte, algunas obras recientes, así como revisiones especializadas sobre tal o cual aspecto de su campo. El desarrollo de la industria agroalimentaria y en particular la utilización de materias primas nuevas, así como la necesidad de crear nuevos productos explica el interés creciente hacia este grupo de bacterias (Leveau y Bouix, 2000).

2. 1. 6. 1. Cultivos iniciadores

Es a partir del año 1900 cuando el desarrollo de las industrias de transformación conduce a la producción industrial de BAL adaptadas a los distintos productos lácteos. En la industria de los alimentos se emplean como cultivos iniciadores para la elaboración de productos alimenticios fermentados tales como yogur, leches, mantequillas, quesos madurados, col agria, embutidos (salami y chorizo) y bebidas alcohólicas como la cerveza, sidra entre otros, donde producen cambios específicos en el aroma, sabor, textura, cuerpo, acidez, humedad, digestibilidad y aspecto de los mismos (Amador y col., 1993; Hammes y Tichaczek, 1994; Leveau y Bouix, 2000).

Las preparaciones usadas como cultivos iniciadores se pueden clasificar atendiendo a múltiples aspectos tecnológicos como velocidad de acidificación, proteólisis, composición y temperatura óptima de crecimiento, las clasificaciones más comunes son basadas en los dos últimos aspectos (Mäyra-Mäkinen y Briget, 1993).

Según la composición se clasifican en cuatro categorías (Mäyra-Mäkinen y Briget, 1993):

- Cultivos de cepa única: formado por una única cepa de una determinada especie.
- Cultivos múltiples: son mezclas de cepas seleccionadas, compatibles. Las cepas se cultivan independientemente y se mezclan poco antes de su comercialización.
- Cultivos mixtos: son mezclas estables de composición (número y naturaleza de las cepas) desconocida. Las cepas se cultivan juntas.
- Cultivos indefinidos o artesanos: está formado por diferentes especies total o parcialmente desconocidas.

En función a la temperatura óptima de crecimiento se dividen en dos grupos: cultivos iniciadores mesófilos cuya temperatura de crecimiento se encuentra en el rango 20-30°C, con un óptimo cerca de los 30°C, y cultivos iniciadores termófilos con una temperatura de crecimiento ubicada en el rango de 37-45°C con un óptimo cerca de 42°C (Cogan y Accolas, 1996).

Cultivos iniciadores mesófilos: Están constituidos esencialmente por lactococos, por ciertos leuconostocs (*Leuc. cremoris* *Leuc. dextranicum*) y por algunos lactobacilos (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*). Las bacterias se clasifican en cepas acidificantes: *Lc. lactis* subesp. *Lactis* y *Lc. lactis* subesp. *cremoris* y en cepas aromatizantes: *Lc. lactis* subesp. *Lactis* biovar *diacetylactis* y *Leuconostoc*. Se utilizan en particular para la fabricación de quesos frescos: Quarg, Feta, Cottage; quesos de pasta blanda: camembert, Brie, Pont l'Évêque, Coulommiers; quesos duros de pasta prensada: Cheddar, Gouda, Edam o de quesos de pasta azul: Roquefort (Leveau y Bouix, 2000).

Cultivos iniciadores termófilos: Abarcan la especie *Streptococcus* (*S. thermophilus*) y *Lactobacillus* (*Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, *Lb. lactis*, *Lb. helveticus* y *Lb. acidophilus*). Son menos sensibles al pH que los mesófilos: *S. thermophilus* y *Lb. bulgaricus* se desarrollan en la leche respectivamente hasta valores de pH de 4.1 y 3.8.

Al ser la temperatura óptima de estas dos especies parecida, es posible el crecimiento en asociación entre 41 y 43°C. *S. thermophilus* asociado a *Lb. helveticus* y a *Lb. delbrueckii* subesp. *Lactis* pero también a *Lb. delbrueckii* subesp. *Bulgaricus* forman la flora de los quesos de pasta cocida como el queso de tipo Suizo: Emmental, Gruyère; de tipo Italiano: Parmesano, Romano, Grana (Leveau y Bouix, 2000).

El rol de estos cultivos en la elaboración de productos lácteos es muy complejo, y de ello dependerá la calidad de los mismos. La primera y principal función es la formación de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, esto conduce a la disminución del pH lo que facilita la coagulación de la leche, texturización de la cuajada y además inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos de manera eficaz. La efectividad de inhibición por acidez también tiene que ver con la naturaleza de dichos ácidos por que se ha demostrado que la forma no disociada es bastante inhibitoria. Adicionalmente estos ácidos orgánicos contribuyen al sabor y olor de muchos quesos (González del Llano y col., 1996).

El espectro de actividad de los compuestos antimicrobianos producidos por las BAL es muy amplio, incluyendo a varias especies pertenecientes al mismo grupo, por ello, es muy importante determinar la compatibilidad entre cepas que formen parte de un cultivo iniciador, y de esta manera se asegura que el proceso fermentativo no falle por esta causa (Piard y Desmazeaud, 1991).

Existen otros factores capaces de afectar la actividad de los cultivos iniciadores que están relacionados con la composición de la leche (sistema lactoperoxidasa, inmunoglobulinas), presencia de pequeñas cantidades de antibióticos producto de tratamientos contra mastitis y cantidades residuales de productos de limpieza utilizados en la industria láctea. Los niveles de antibióticos que inhiben los cultivos iniciadores dependen de cada cepa, en general los cultivos mesófilos son menos sensibles a la penicilina que los cultivos termófilos (Tornadijo y col., 1998; Magariños, 2000).

En las dos últimas décadas las BAL han recibido mucha atención, particularmente los géneros utilizados como cultivos iniciadores debido a su gran importancia. Las

investigaciones se enfocan en aislar nuevas cepas con el fin de estudiar sus potencialidades de cultivos iniciadores. Una fuente inagotable de cepas la constituyen los productos artesanales, en especial los quesos (Alvarado, 2000).

2. 1. 6. 2. Probióticos

Cada vez es mayor el interés de las BAL y su uso como probióticos, los cuales la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial para la Salud (OMS) los han definido como organismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio saludable en el huésped (Castro y Restrepo, 2006).

Tienen las siguientes características: propiedades no patogénicas ni toxigénicas, resistencia a productos tecnológicos y viabilidad en productos comerciales, estabilidad en secreciones gástricas del estómago y biliares en el duodeno, capacidad de adhesión a células epiteliales del intestino, habilidad para adaptarse dentro del tracto gastrointestinal sin desplazar la microbiota nativa, producción de sustancias antimicrobianas, habilidad para modular el sistema inmune y para influenciar actividades metabólicas. Además mejoran las propiedades de la flora nativa, protegen de infecciones gastrointestinales, aumentan el valor nutritivo de los alimentos, favorecen la tolerancia a lactosa, reducen la acumulación de compuestos tóxicos o cancerígenos en el alimento, disminuyen los niveles de colesterol en sangre y/o controlan algunos tipos de cáncer, así también se emplean como vehículos en la administración de vacunas (Dunne y col., 2001; Young y Huffmans, 2003).

Los microorganismos comúnmente utilizados como probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Saccharomyces*, los cuales ejercen su función de una manera directa o indirecta a través de la modificación de la flora entérica endógena, o bien realizando un efecto inmunomodulador. Presentes en diversos medios, estas bacterias pueden transformar numerosas fuentes de azúcares: lactosuero, ensilados, extractos vegetales, almidón hidrolizado, etc., enriqueciendo el medio en vitaminas, aminoácidos o enzimas (β -galactosidasa) (Leveau y Bouix, 2000; Contardo y col., 2005).

Existen a su vez diferentes grupos de probióticos (Contardo y col., 2005):

1. Probióticos naturales: Corresponden principalmente a productos lácteos fermentados (yogures, leche y quesos), vegetales, carnes y pescados fermentados. La cantidad de microorganismos que contienen es muy baja.

2. Probióticos comercializados: productos naturales comercializados (sintetizados a partir de diferentes cepas de microorganismos, que los contienen en forma más concentrada). Ejemplos de estos son: Uno al día®, Chamyto® y NAN 2®.

3. Suplementos alimenticios que contienen probióticos: La única diferencia con los anteriores es que el probiótico no está contenido en el alimento, sino que se encuentra encapsulado y separado. Agentes bioterapéuticos, son microorganismos que tienen un efecto terapéutico demostrado. Dentro de estos tenemos como ejemplos Perenteryl® (*Saccharomyces boulardii*) y Biolactus® (*Lb. rhamnosus*).

2. 1. 7. Compuestos antimicrobianos producidos por BAL

Las BAL son conocidas por producir, durante su crecimiento, sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Esta característica se utiliza para la destrucción de bacterias indeseables o patógenas en la fabricación de los alimentos. La mayor parte de estos compuestos no están caracterizados ni en cuanto a su naturaleza bioquímica ni en cuanto a su mecanismo de acción. Con frecuencia incluso, los productos activos no son más que metabolitos excretados por la bacteria como el ácido láctico o derivados del metabolismo del oxígeno como el H₂O₂ (Leveau y Bouix, 2000).

En la actualidad se considera a las bacterias lácticas microorganismos GRAS por lo que su utilización y/o la de sus metabolitos como bioconservadores está recibiendo una gran atención (Gould, 1996; Stiles, 1996).

Los principales mecanismos de antagonismo microbiano de las BAL son la competencia por nutrientes y la formación de ácidos láctico y acético, con el consiguiente descenso del pH (Kandler, 1983; Daeschel, 1989; Lindgren y Dobrogosz, 1990).

Además, pueden producir otras sustancias antimicrobianas como etanol, CO₂, diacetilo, acetaldehído, H₂O₂, ácido benzoico, isómeros D de aminoácidos, reuterina y bacteriocinas. Ciertas actividades inhibitoras con frecuencia sólo se encuentran en medios sólidos (Piard y Desmazeaud, 1991; Requena y Peláez, 1995; Leveau y Bouix, 2000).

2. 1. 7. 1. Ácidos orgánicos

En 1880, el ácido láctico fue el primer ácido orgánico microbiano producido a nivel industrial; en la actualidad esta producción es de alrededor de 20,000 toneladas por año, produciéndose industrialmente a partir de materiales amiláceos hidrolizados químicamente o enzimáticamente y/o a partir de sacarosa (Leveau y Bouix, 2000).

Las bacterias lácticas fermentan los carbohidratos obteniendo durante el proceso ácidos orgánicos, principalmente láctico y acético, que no son utilizados por las células y se excretan al exterior (Kandler, 1983).

Estos ácidos contribuyen al desarrollo del sabor, aroma y textura de los productos fermentados. El ácido acético tiene mayor capacidad antimicrobiana que el láctico, pudiendo inhibir levaduras, mohos y bacterias (Blom y Mortvedt, 1991).

El mecanismo de inhibición se basa en la disminución del pH del medio, aumentando la proporción de ácidos orgánicos en su forma no disociada. Estos ácidos, debido a su naturaleza lipofílica, atraviesan la membrana celular por difusión pasiva, disociándose en el citoplasma; ejerciendo su efecto inhibitorio interfiriendo en funciones celulares como la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa, provocando un bombeo de protones hacia el interior de las células y una posible desestabilización de la membrana. Cuando esta concentración de protones excede la capacidad tamponadora del citoplasma, comienza actuar la bomba de protones hasta agotar las reservas energéticas de la célula. El pH interno desciende, causando desnaturalización de proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de la célula (Baird-Parker, 1980; Piard y Desmazeaud, 1991; De Vuyst y Vandame, 1994; Requena y Peláez, 1995).

Las bacterias lácticas son inmunes a este mecanismo pudiendo sobrevivir y desarrollarse a valores de pH relativamente bajos, ya que poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, genera energía (Tseng y Montville, 1993).

2. 1. 7. 2. Diacetilo y acetaldehído

En la industria alimentaria las bacterias heterofermentativas son más importantes que las homofermentativas por la producción de compuestos que imparten aroma y sabor, tales como el acetaldehído y el diacetilo (Jay, 2000).

El diacetilo o 2,3-butanodiona es el principal componente del aroma de la mantequilla y otros productos lácteos fermentados, siendo el producto final de la fermentación del citrato presente en la leche (~8,3 mmol/L) por bacterias lácticas, principalmente por *Leuconostoc* y *Lactococcus lactis* subesp. *lactis biovar diacetylactis* (Hugenholtz, 1993; Vandenberg, 1993).

Su acción antimicrobiana es bactericida para las bacterias Gram negativas y bacteriostática para las Gram positivas, debido al grupo α , α -dicarbonil de la molécula, que reacciona con la porción guanido del aminoácido arginina de las enzimas microbianas, desactivándolas por bloqueo o modificación de la zona catalítica (Lindgren y Dobrogosz, 1990; De Vuyst y Vandame, 1994).

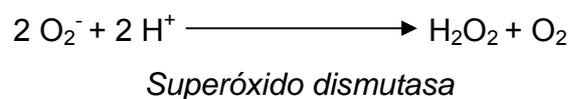
Posee actividad inhibitoria frente a *S. aureus*, *S. typhimurium* y *E. coli* a concentraciones de 10-100 ppm (Piard y Desmazeaud, 1991; Cogan y Hill, 1993).

El acetaldehído aparece en muchos productos lácteos, pero fundamentalmente en el yogur donde es el principal responsable del aroma; alcanzando concentraciones de aproximadamente 25 ppm por lo que podría ejercer un efecto antimicrobiano, aunque los niveles presentes en otros productos fermentados son insuficientes para dicha actividad. Su producción se atribuye al metabolismo del piruvato y la reacción de la treonina aldolasa que transforma la treonina en acetaldehído y glicina (Accolas y col., 1980; Caplice y Fitzgerald, 1999).

2. 1. 7. 3. Peróxido de hidrógeno

Las bacterias lácticas producen H₂O₂ como mecanismo de protección frente al oxígeno, mediante la acción de oxidasas o NADH peroxidasas y al carecer de una catalasa que elimine el H₂O₂ generado, se acumula en el medio (Condon, 1987; Dahl y col., 1989).

La acción inhibitoria se atribuye a su efecto altamente oxidante, produciendo la peroxidación de los lípidos de la membrana y la destrucción de la estructura básica molecular de proteínas celulares (Dahl y col., 1989).



2. 1. 7. 4. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados en los ribosomas, producidas por bacterias que exhiben una acción bactericida o bacteriostática sobre especies de bacterias sensibles, no afectan al hospedador, son termoestables, algunas soportan 121°C durante 15 min y resistentes a la acción de muchas proteasas (Madigan y col., 2004; Doyle y Beuchat, 2007).

González y col. (2003), señalan que la acción antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimentaria ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios.

Características de las bacteriocinas (Fernández, 2000):

- Polipéptidos
- Termorresistentes
- Resistentes a proteasas
- Solubles en agua
- Activas en amplios valores de pH

- No imparten sabor o aromas
- Bactericidas
- Corto espectro de acción antibacteriana
- Inócuas.

Dodd y Gasson (1994) clasifican las bacteriocinas en tres grupos: péptidos pequeños termoestables, proteínas grandes (>30kDa) termolábiles y péptidos modificados, llamados lantibióticos. En el primer grupo se encuentran por ejemplo, la lactococcina G y pediocina AcH. Del segundo grupo puede mencionarse a la helveticina J y la ácido filucina A y del tercero la nisina y la lacticina.

Las bacterias que sintetizan bacteriocinas disponen de un mecanismo autoprotector al que se le da el calificativo de inmunidad. El término resistencia en cambio, se aplica a las bacterias no productoras, igualmente insensibles (Harris y col., 1992).

Las bacteriocinas de las BAL, cuando son purificadas, sólo son activas contra las bacterias Gram positivas. Su espectro de acción, con excepción de la nisina y la pediocina A, está restringido a las especies próximas a la cepa productora o presentes en el mismo nicho ecológico (Leveau y Bouix, 2000).

2. 1. 7. 4. 1. Modo de acción

Klaenhammer (1993) afirma que la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células sensibles es un mecanismo de acción común presentado por las bacteriocinas producidas por las BAL en su forma bactericida o bacteriostática. La nisina y algunos péptidos pequeños, como lactacina, por ejemplo, actúan mediante este mecanismo (Bruno y Montville, 1993).

La estructura secundaria de las bacteriocinas como la α -hélice o la estructura β -laminar, pueden formar poros complejos en las membranas de las células, dando por resultado la salida de compuestos celulares tales como iones K^+ , ATP, aminoácidos y moléculas pequeñas. La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida del potencial de membrana, el consumo de reservas energéticas celulares, un descenso en la

síntesis de ADN, ARN y proteínas, originando finalmente la muerte celular (Bruno y Montville, 1993; Muriana, 1996).

Por otra parte, en relación al modo de acción antimicrobiano de las bacteriocinas, Andersson y col. (1988), lo dividen en dos etapas:

- Adsorción de la bacteriocina a receptores específicos de la célula
- Muerte de la célula por daño de la membrana

La primera etapa es reversible, donde la bacteriocina adsorbida puede inactivarse con proteasas y la célula resulta viable, en cambio la segunda es irreversible, debido a que el efecto letal en ocasiones no parece ir asociado a la lisis celular, ya que se ha comprobado la acción bactericida sin reducción de la densidad óptica. La adsorción en este caso no es específica, ya que se ha observado la unión de las bacteriocinas a células resistentes, lo que parece indicar que la sensibilidad o resistencia no está determinada únicamente por la presencia o ausencia de receptores en la superficie celular (Medina y col., 1992).

2. 1. 8. Antibióticos

El término antibiótico cuyo origen viene del griego anti “contra” y bios “vida” fue propuesto para definir sustancias dotadas de actividad antimicrobiana y extraídas de estructuras orgánicas vivientes, ya fueren bacterias, hongos o algas, con capacidad para anular la vida de diversos microorganismos (Lanosa, 1997).

Con frecuencia se han utilizado de manera indistinta los términos antibiótico, antimicrobiano y quimioterápico para designar sustancias químicas definidas con actividad contra microorganismos específicos, el antibiótico es una sustancia producida en la naturaleza por microorganismos vivos o sintetizados en el laboratorio. Desde el punto de vista técnico, los antibióticos difieren de los quimioterápicos en que estos últimos son productos de síntesis química, por lo que se ha propuesto el término antimicrobiano para describir a todas las sustancias con esta actividad, ya sean naturales o de origen sintético (Cordiés y col., 1998).

2. 1. 8. 1. Residuos de antibióticos en leche

El uso de antibióticos en medicina veterinaria, sin lugar a dudas ha sido una de las principales herramientas en el control y erradicación de enfermedades infecciosas de origen bacteriano en animales de abasto y compañía. Sin embargo, casi paralelamente con su introducción a fines de la Segunda Guerra Mundial, se comenzó a investigar en torno a los efectos adversos que pudieran provocar la presencia de estos fármacos en productos destinados a consumo humano, como son leche, carne y huevos (San Martín y Moraga, 1996).

La presencia de concentraciones de antibióticos en leche que son superiores a las permitidas por normas sanitarias recibe, en general, la denominación de residuos, concentraciones residuales o inhibidores. La mayor parte de las muestras de leche que contienen concentraciones residuales corresponden a vacas que han recibido tratamiento con antibióticos por distintas vías, tanto a nivel sistémico como local: intramamario o intrauterino (Zurich y San Martín, 1994).

Desde la aparición de los antibióticos como principal elemento de lucha antibacteriana, ha existido preocupación por organismos de países de gran desarrollo lechero, quienes han dictado normas que han sido acogidas por otras naciones. Así, en 1962, la FDA de Estados Unidos dictó normas de control de antimicrobianos en alimentos de origen animal estableciendo sanciones para quienes violen estas disposiciones. Por otra parte, en Inglaterra, algún tiempo después, el Milk Marketing Board introduce, con carácter obligatorio, un test de residuos en leche y dicta normas sobre manejo de antibióticos en la vaca lechera. A fines de la década de los 60's, la OMS y la FAO establecen normas con fines de información y orientación de los países miembros, respecto de las concentraciones de residuos permitidas en leche de antibióticos de uso frecuente en ganado lechero, listado que ha ido incrementando en número de acuerdo a la incorporación de nuevos agentes antibacterianos. En la actualidad se cuenta con un listado (Tabla 4) que permite conocer las concentraciones máximas permitidas en la leche (Zurich y San Martín, 1994).

Tabla 4. Niveles de tolerancia* según recomendaciones OMS y FDA (2005).

Antibióticos (µg/mL)	FDA	OMS
Betalactámicos		
Ampicilina	0.01	0.01
Amoxicilina	0.01	-
Penicilina G (Na, K)	-	0.005
Cloxacilina	0.01	0.02
Cefapirina	0.02	0.01
Aminoglicósidos		
Estreptomicina	0.125	0.2
Gentamicina	0.03	-
Neomicina	0.15	0.15
Misceláneos		
Tetraciclina	0.08	0.1
Oxitetraciclina	0.03	0.1
Cloranfenicol	Cero	Cero
Novobiocina	0.15	0.10
Sulfaderivados	0.01	-
Eritromicina	0.05	0.04

*Concentraciones máximas permitidas en leche para consumo humano.

2. 1. 8. 1. 1. Clasificación de residuos de antibióticos según su cinética

En relación a los antibióticos utilizados en medicina veterinaria y que pueden ser fuente de residuos en leche, los estudios de su cinética ha permitido sugerir una clasificación en los grupos que se indican (Zurich y San Martín, 1994):

Grupo 1. Antibióticos hidrosolubles de rápida absorción y en proporción superior al 90% desde el punto de aplicación. Escasa unión, y muy lábil, a proteínas plasmáticas y tisulares con volúmenes de distribución bajos. Estos antibióticos se eliminan con gran rapidez (tanto en forma libre como la fracción inactivada). Pertenecen a este grupo las penicilinas naturales (bencilpenicilina sódica y potásica), penicilinas semisintéticas (ampicilina, amoxicilina, cloxacilina), cefalosporinas, sulfas de duración corta e intermedia. Todos estos antibióticos en forma de sales solubles y vehículos de liberación rápida. Los antibióticos pertenecientes a este grupo, por su rápida cinética de absorción y de eliminación presentan menores posibilidades de originar residuos y sus períodos de resguardo son más cortos.

Grupo 2. Antibióticos de absorción rápida o de moderada velocidad, determinada en algunos casos por el excipiente. La absorción no supera el 70%. La macromolécula del antibiótico o del vehículo caracteriza esta condición. Igual cosa se presenta con las soluciones oleosas que, afortunadamente, tienden a ser evitadas para el uso parenteral en veterinaria. La vida media fluctúa entre 3 a 6 h.

Entre los antibióticos pertenecientes a este grupo es necesario mencionar a eritromicina, tilosina, espiramicina, sulfametazina.

Grupo 3. Corresponden a antibióticos de absorción lenta y, a menudo, incompleta. Presentan vidas medias de eliminación superiores a 12 h producto, en la mayoría de los casos, de su gran afinidad por proteínas plasmáticas o tisulares. Entre los antibióticos, es necesario mencionar a sulfas de duración larga como sulfadoxina y aminoglicósidos. Estos son de rápida absorción y excreción urinaria pero por su polaridad se mantienen fijos a estructuras del riñón por períodos cercanos a los 30 días.

2. 1. 8. 2. Problemas que plantean los residuos de antibióticos

Los residuos de antibióticos, cuando se encuentran presentes en la leche ocasionan graves problemas en los procesos tecnológicos y en la salud pública (Magariños, 2000).

2. 1. 8. 2. 1. Problemas tecnológicos

La producción de productos fermentados es la más afectada en la industria cuando en la leche recibida están presentes residuos de antibióticos, provocando grandes pérdidas en calidad y, por ende, económicas. Por ejemplo, las bacterias utilizadas en la fabricación de yogur, *Lb. bulgaricus* y *S. termophilus* resultan ser unas de las más sensibles a los antibióticos. Las bacterias, por efecto de los antibióticos, presentan cambios morfológicos y pueden darse situaciones en que los cultivos iniciadores sean reemplazados por microorganismos indeseables, provocando la inutilización del producto porque se convierte en peligroso para su consumo (Magariños, 2000).

Los quesos elaborados con leche que presenta residuos de antibióticos muestran una estructura esponjosa y sabor ligeramente amargo. Además, los residuos de antibióticos

pueden actuar sobre algunos componentes de la leche; por ejemplo, se ve afectada la lipasa de la leche que pierde entre el 7 y el 49% de su actividad dependiendo del tipo de antibiótico que se trate y de su concentración (Cerna y col., 1982).

Además de los efectos en los productos lácteos fermentados, la industria se ve perjudicada en pruebas de control de calidad a la que es sometida la leche a nivel de recepción. Tal es el caso del test de tiempo de reducción de azul de metileno, que aumenta cuando la leche está contaminada con antibióticos, lo que trae como consecuencia un error en la clasificación de la leche (Sischo, 1996).

Los principales efectos provocados por la presencia de antibióticos en la elaboración industrial de quesos y productos fermentados son (Oh, y col., 1996):

- Demora en la acidificación
- Demora en la coagulación
- Coagulación deficiente
- Disminución de la retención de agua
- Desarrollo de microorganismos indeseables
- Interferencia en la formación de aromas en mantequilla fermentada
- Alteración de las características normales del producto:
 - Cuerpo débil
 - Textura blanda
 - Sabor amargo (excesiva acción del cuajo)
 - Consistencia arenosa (yogur).

Una posible solución a este problema podría ser la utilización de cepas menos sensibles a estos antibióticos, aunque esto entraña un riesgo potencial para la salud pública.

2. 1. 8. 2. 2. Importancia en la salud pública

En la actualidad no se conocen informes sobre intoxicaciones provocadas por antibióticos de uso común ingeridos a través de la leche y se explica porque sus

concentraciones resultan ser muy bajas para provocar un efecto tóxico, con la excepción, posiblemente, del cloranfenicol, que es capaz de producir, de acuerdo a algunos investigadores, anemias aplásticas por depresión de la médula ósea, al suministrarse dosis bajas por periodos cortos de tiempo. No obstante lo anterior, subsiste la duda de si el consumo de antibióticos por el hombre, a través de alimentos contaminados, puede alcanzar niveles que determinen una toxicidad de tipo crónico, motivo más que suficiente para prohibir la presencia de éstos en los alimentos. Otro de los problemas que ocasiona en el ser humano el antibiótico presente en la leche, lo constituyen las reacciones de tipo alérgico que se producen luego de un periodo de sensibilización, en el cual se generan en el sistema retículo endotelial anticuerpos contra la droga administrada que actúa como antígeno. El contacto con los antígenos, continuado o periódico, provoca la reacción alérgica que resulta desproporcionada con la dosis ingerida (Magariños, 2000).

Además del problema de las reacciones alérgicas, los antibióticos presentes en la leche pueden provocar los siguientes efectos en el consumidor (Bartlett, 1990):

- Alteración de la flora intestinal
- Estimulación de bacterias antibiótico-resistentes
- Desarrollo de microorganismos patógenos
- Reducción de la síntesis de vitaminas.

2. 1. 8. 3. Métodos de detección de residuos de antibióticos

Diversos métodos han sido empleados para los fines de detectar residuos de antimicrobianos en leche, y su aplicación depende básicamente de los recursos económicos. Los métodos de mayor sensibilidad corresponden a técnicas fisicoquímicas como por ejemplo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), electroforesis, métodos inmunológicos como el radioinmunoensayo y uno de los más modernos, el Charm II. El empleo de estos métodos, debido fundamentalmente a sus elevados costos, ha limitado su uso (Cullors, 1992; Keukens y col., 1992; McEwen y col., 1992).

Existen además los métodos microbiológicos, que pueden ser cualitativos y cuantitativos, y se basan en la capacidad de difusión del antibiótico en un medio de cultivo que contiene determinada cepa bacteriana. Éstos tienen la ventaja de ser fácilmente implementables, poseer bajos costos y otorgar una adecuada confiabilidad, razón por la cual siguen siendo aún métodos de elección en análisis de rutina. Así por ejemplo, el Commonwealth of Pennsylvania (USA.) los utiliza como métodos oficiales para detectar residuos de antimicrobianos en leche (Booth y Harding, 1986; Cullors, 1992; Sicho y Burns, 1993).

2. 1. 8. 4. Mecanismo de acción de los antibióticos ensayados

En la figura 3 se muestra el mecanismo de acción descrito por Cloutier (1995) de los diferentes antibióticos, así como los sitios y nivel al que actúan.

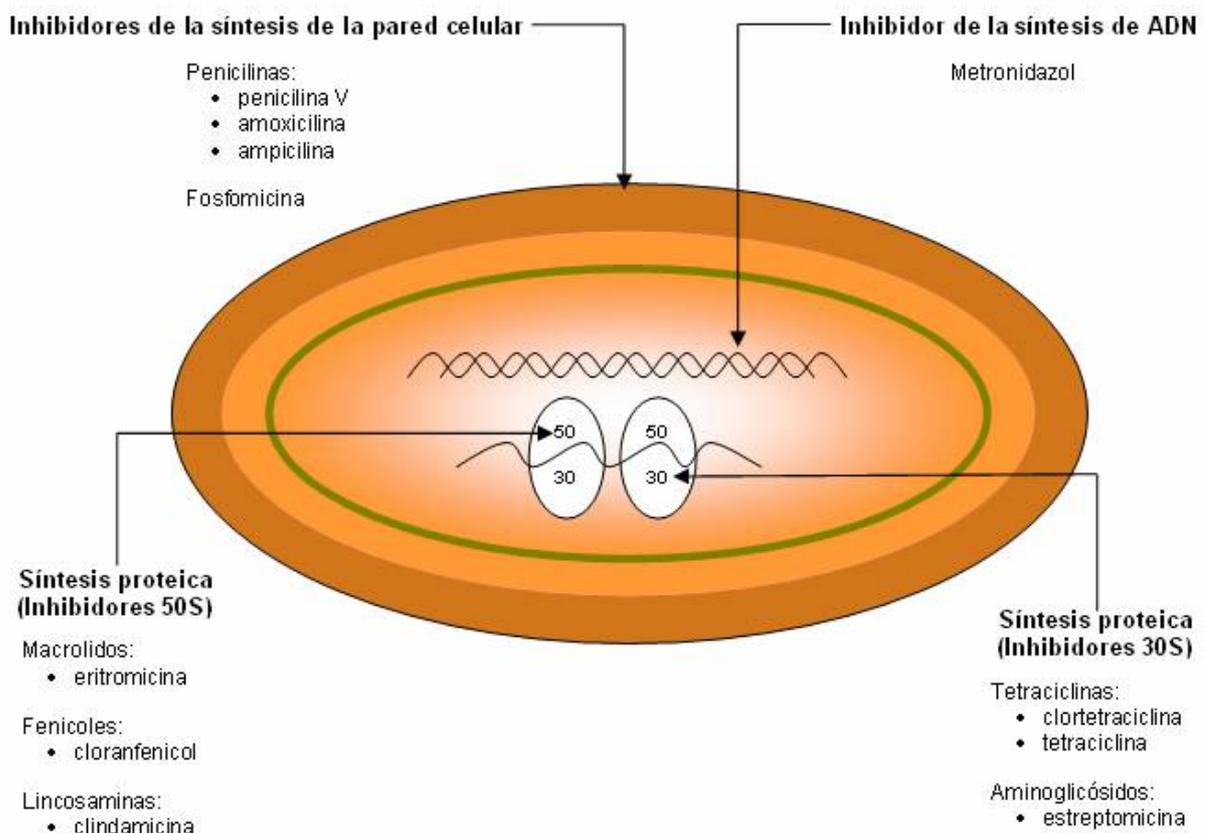


Figura 3. Mecanismos de acción de los distintos antibióticos (Adaptada de Cloutier, 1995).

2. 1. 8. 4. 1 Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

Los inhibidores de la síntesis de los ácidos nucleicos actúan por este mecanismo inhibiendo de forma selectiva a la enzima ARN polimerasa dependiente del ADN, la cual cataliza la transcripción de la información genética contenida en el ARNm y se convierte así en un potente bactericida (Thompson, 1987; Greenwood, 1992; Cordiés y col., 1998).

Metronidazol: Fue introducido en el año 1959, pero fue hasta la década de los 70's cuando se popularizó para el tratamiento de infecciones causadas por anaerobios Gram negativos tales como *Bacteroides* o anaerobios Gram positivos, por ejemplo *Clostridium*. Además de ser útil en la actualidad contra infecciones parasitarias, sigue siendo un antibiótico con gran actividad bactericida frente a un gran número de bacterias anaerobias y algunas microaerófilas (Freeman y col., 1997; Samuelson, 1999; Martinez y Caumes, 2001; Raether y Panel, 2003).

Mecanismo de acción: Tras ingresar en la célula mediante difusión pasiva es químicamente reducido por proteínas del metabolismo anaerobio (proteínas de transporte de electrones de bajo potencial redox). Estas proteínas son exclusivas de algunos parásitos, bacterias anaerobias y algunas microaerófilas. El metronidazol reducido ejerce su acción antibacteriana y antiprotozoaria produciendo compuestos que son tóxicos para la célula, pérdida de la estructura helicoidal del ADN, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular (Samuelson, 1999).

Mecanismo de resistencia: El mecanismo principal de resistencia está relacionado con la aparición de mutaciones que producen una disminución de la reducción intracelular del antibiótico y por lo tanto de producir sus derivados activos. Habría otros posibles mecanismos de resistencia y en bacterias del grupo *B. fragilis* se han descrito por lo menos 3 genes implicados en la resistencia a los nitroimidazoles. Estos genes pueden estar localizados en plásmidos o en el cromosoma (Freeman y col., 1997).

2. 1. 8. 4. 2. Inhibidores de la síntesis de pared celular

La estructura de la pared celular es un polímero denominado peptidoglicano, cuya síntesis se divide en 3 etapas principales, cada una de éstas es inhibida por un grupo de antibióticos diferentes. En la primera etapa se forma el UDP-N-acetilmuramyl-pentapéptido en el citoplasma bacteriano. En la segunda etapa se polimerizan el UDP-N-acetilmuramyl-pentapéptido y la N-acetilglucosamina que son transportados a través de la membrana citoplasmática y se unen al punto de crecimiento de la pared bacteriana. Esta fase es inhibida por antibióticos como la vancomicina y la bacitracina. Por último las cadenas de peptidoglicano, una vez fuera de la célula, quedan entrelazadas transversalmente y dan lugar a la formación de un polímero tridimensional, esta etapa, también conocida como reacción de transpeptidación es inhibida por las penicilinas y las cefalosporinas (Cordiés y col., 1998).

Penicilina: En 1928, aunque lo dio a conocer en 1929, Alexander Fleming observó, de forma casual, que algunas colonias de estafilococos se lisaban cuando el medio de cultivo se contaminaba en su laboratorio por el hongo *Penicillium notatum*. A esta sustancia, que llamó penicilina, no se le concedió inicialmente importancia terapéutica. Las diferentes penicilinas que primero se obtuvieron industrialmente fueron identificándose por letras: F o pentenilpenicilina, G o benzilpenicilina, K o heptenilpenicilina y X o hidroxibencilpenicilina. De todas ellas, la que mostró mejores propiedades antibacterianas fue la penicilina G. Pronto se comprobó que esta clase de penicilina podía obtenerse de forma exclusiva añadiendo ácido fenilacético al caldo de fermentación del hongo; este ácido lo utilizaba el hongo como fuente de su cadena lateral. El núcleo de dicha penicilina es el ácido 6-amino-penicilánico (6-APA), que es la condensación de alanina y β -metilcisteína. El aislamiento de este ácido fue muy importante, pues de esta forma pudieron prepararse otras penicilinas añadiendo al grupo NH_2 del ácido 6-APA diferentes cadenas laterales estructuradas por síntesis química, con los siguientes objetivos principales:

1. Obtener compuestos resistentes a la betalactamasa estafilocócica.
2. Conseguir formulaciones de mayor espectro y actividad que la penicilina G.
3. Desarrollar penicilinas de utilización oral (Albu, 1998; Belal y col., 2000).

En la actualidad, se obtienen diversas penicilinas semisintéticas pertenecientes al grupo de los antibióticos betalactámicos (ATB) a partir de *P. chrysogenum*, los cuales son ampliamente utilizados en terapéutica antiinfecciosa (Katzung, 2005).

Estructuralmente todas las penicilinas constan de tres partes claramente diferenciadas con propiedades y funciones diferentes (Gómez y col., 1998):

Cabeza: Es un anillo de tiazolina, tiene un grupo carboxilo libre en posición 5 que es capaz de unirse a una enzima específica en el momento de su actuación. El anillo de tiazolina sirve de protección al anillo betalactámico, evitando su destrucción. Las modificaciones en el anillo de tiazolina pueden dar lugar a nuevas propiedades farmacocinéticas y antibacterianas del antibiótico. Así, cuando se sustituye el átomo de azufre que existe en posición 4, y también cuando se sustituyen o eliminan los grupos metilo de la posición 3, se obtienen inhibidores de las betalactamasas.

Cuerpo: Está constituido por el anillo betalactámico, que es el principal responsable de la acción antibacteriana. Los átomos de hidrógeno de este anillo están en posición "cis", lo que es imprescindible para su acción. Este anillo es altamente lábil, reaccionando fácilmente con las betalactamasas bacterianas. Cuando se produce la ruptura del anillo betalactámico, el antibiótico pierde su efecto antibacteriano. Además, al romperse se forman haptenos capaces de unirse a restos amidados libres. Los antígenos así formados pueden dar lugar a reacciones de hipersensibilidad.

Cola: Es una cadena lateral que parte del grupo amino de la posición 6. Es variable, y sus modificaciones conllevan aspectos concretos. Esta cadena es, por tanto, la responsable de muchas de las propiedades farmacocinéticas, de espectro y de potencia antibacteriana que caracterizan a cada una de las penicilinas.

Tipos de penicilina.

Existen cinco grupos de penicilinas: naturales (penicilina G y V), resistentes a penicilinasas (cloxacilina), aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina), antipseudomonas y las asociaciones de penicilinas con inhibidores de las betalactamasas (Wright, 1999).

Penicilinas naturales: La penicilina G (bencilpenicilina) y la penicilina V (fenoximetilpenicilina), son activas contra cepas sensibles de cocos Gram positivos, pero sufren de hidrólisis por la penicilinasasa. La penicilina G y la penicilina V son fármacos de primera elección en muchas infecciones por Gram positivos. La penicilina V es producida por *P. chrysogenum* en medios que contienen ácido fenoxiacético como precursor. Se presenta en forma de sal potásica, que es hidrosoluble y estable a pH ácido, por lo cual su vía de administración es oral (Wright, 1999).

Aminopenicilinas.

Ampicilina: Es la primera penicilina semisintética de un subgrupo denominado aminopenicilinas, descubriéndose que el epímero D (-) con un grupo fenil era el más activo de los derivados sintetizados, es un betalactámico que se desarrolló como respuesta a la necesidad de encontrar derivados de la penicilina con mayor espectro, dada la aparición de cepas resistentes. Su estructura química está compuesta por un anillo betalactámico, un anillo tiazolidínico y un grupo amino en la cadena lateral unida a la estructura básica de la penicilina, lo cual le confiere la capacidad para administrarse por vía oral al ser más activa que las penicilinas naturales ya que es resistente a los medios ácidos. *Listeria monocytogenes* y algunos bacilos entéricos como *E. coli*, *Salmonella*, y *Shigella* son sensibles a la ampicilina (Bear y col., 1970).

Amoxicilina: Es un antibiótico betalactámico, semisintético derivado de la penicilina, con mayor espectro de actividad antibacteriana que ésta, ya que es un derivado del núcleo α -amino-p-hidroxibencilpenicilina y cuenta con un radical amino (NH₂) y un oxidrilo (OH) en la posición del benceno. Este último lo diferencia de las demás aminopenicilinas y le permite una mejor absorción, distribución y concentración tanto en tejidos como en sangre, y no requiere transformarse en ampicilina para ejercer su actividad biológica. Actúa contra un amplio espectro de microorganismos, tanto Gram positivos como Gram negativos. Por esto se emplea a menudo en infecciones de diferente gravedad, tanto en medicina humana como en veterinaria (García y col., 1998).

Mecanismo de acción betalactámicos: Los antibióticos betalactámicos son bactericidas, capaces de penetrar bacterias Gram positivas, algunas Gram negativas y anaerobias. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular, específicamente la enzima transpeptidasa, evitando la formación del peptidoglicano, y por lo tanto el entrecruzamiento de las cadenas lineales que dan rigidez, fuerza y forma a la mayor parte de las paredes de los microorganismos Gram positivos. El peptidoglicano es un polímero formado por 2 amino azúcares alternantes: el N-acetil-glucosamina y el ácido N-acetil-murámico (Belal y col., 2000).

Para que los antibióticos betalactámicos ejerzan su mecanismo de acción, es primordial que tengan íntegro su anillo betalactámico, el cual, al pasar a través de las porinas de la bacteria, se fijará en sus sitios de acción, que son las proteínas presentes por debajo de la pared celular, conocidas como proteínas fijadoras de penicilina "PBPs" (por sus siglas en inglés Penicillin Binding Proteins). Una vez que el antibiótico ha actuado, debilita la pared celular y forma un orificio (lisis) provocando el estallamiento de la bacteria por la presión osmótica del exterior. También es fundamental que la bacteria se encuentre en pleno proceso de fisión binaria (Surawicz y col., 1989; Albu, 1998).

Mecanismo de resistencia betalactámicos: Las bacterias pueden ser resistentes a los antimicrobianos de forma natural o adquirida. La resistencia adquirida a los betalactámicos, puede producirse por cuatro mecanismos (Gómez y col., 1998):

1. **Betalactamasas:** La producción de betalactamasas es el mecanismo más importante de resistencia bacteriana a las penicilinas. Impiden el contacto entre el antibiótico y las PBPs. Son enzimas que rompen por acción hidrolítica la unión amida-carbonilo del anillo betalactámico, transformándolo en un anillo penicilinoico sin actividad antibacteriana. En las bacterias Gram positivas, la producción de betalactamasas en unos casos está codificada por plásmidos y en otros es de origen cromosómico, las cuales son secretadas al exterior, mientras que las Gram negativas las secretan al espacio periplasmático y son de origen cromosómico o plasmídico, inducible (se expresa al exponer a las bacterias a concentraciones subinhibitorias del antibiótico) o constitutiva (toda la población la expresa).

2. Cambios en la afinidad por las PBPs: al perder afinidad por los antibióticos betalactámicos (ATB) se pierde también la potencia antibacteriana. Requieren aumentos muy marcados de la concentración del antibiótico para llegar al efecto bactericida. La afinidad de las PBPs por las penicilinas no es uniforme, y además varía en función de la especie bacteriana. La resistencia por este mecanismo se debe a la existencia o a la formación de PBPs que tienen baja afinidad para la unión con el antibiótico. La resistencia adquirida se produce por mutación que afecta a una o más de las PBPs. Para que la bacteria se haga resistente suele ser necesario que el cambio afecte a más de una PBPs.

3. Impermeabilidad de la membrana: La membrana externa de las bacterias Gram negativas es siempre una barrera, más o menos importante, para la penetración de antibióticos. En consecuencia puede ser un obstáculo insalvable para que las penicilinas alcancen las PBPs. Las bacterias Gram positivas no presentan este mecanismo de resistencia, pues no tienen membrana externa parietal.

4. Tolerancia: No es un verdadero mecanismo de resistencia. Se presenta en algunas mutantes de cocos Gram positivos que tienen anulado o eliminado su sistema de autolisinas. Cuando así acontece, esas bacterias son inhibidas por las penicilinas, pero no son lisadas, a no ser que se empleen concentraciones muy superiores.

Fosfomicina: La fosfomicina es un antibiótico natural que data del año 1969, pertenece al grupo de los fosfonatos con acción bacteriostática. Aislado inicialmente del hongo *Streptomyces fradie*, es de amplio espectro, aunque su actividad es más pronunciada frente a los gérmenes Gram positivos, bacterias aerobias y anaerobias. En la actualidad se produce exclusivamente por síntesis química (Gobernado, 2003).

La fosfomicina se asemeja estructuralmente al fosfoenolpiruvato, uno de los precursores utilizados por las bacterias para la síntesis de los peptidoglicanos. El mecanismo de acción de la fosfomicina difiere por tanto de la de los antibióticos betalactámicos que interfieren la síntesis de la pared celular bacteriana inhibiendo las reacciones de entrecruzamiento de los peptidoglicanos (Patel y col., 1997).

Mecanismo de acción: la fosfomicina penetra en las células bacterianas a través de dos sistemas de permeasas, uno que transporta el L- α -glicerol-fosfato y otro inducible que lleva a la D-glucosa 6-fosfato. Una vez dentro actúa impidiendo la síntesis de la pared inhibiendo la primera etapa de la síntesis de peptidoglicano, al inactivar de forma irreversible la enzima bacteriana enolpiruvato-transferasa ocupando el lugar del fosfoenolpiruvato. De esta manera no puede tener lugar la reacción de la UDP-N-acetilglucosamina con el fosfoenolpiruvato, reacción que constituye el primer paso de la síntesis de la pared celular bacteriana. Aunque la fosfomicina se une a otras enzimas dependientes del fosfoenolpiruvato, no lo hace de forma irreversible. La inhibición de la síntesis de peptidoglicanos origina una acumulación de los nucleótidos precursores con la correspondiente inactivación de la bacteria (Schonbrunn y col., 1996).

Este mecanismo de acción hace que el efecto de la fosfomicina sea bactericida frente a las bacterias que se encuentran en fase de crecimiento, pero es inactiva frente a las bacterias en fase de reposo (Skarzynski y col., 1996).

Mecanismo de resistencia: La resistencia puede ser de origen cromosómico o plasmídico. El tipo de resistencia bacteriana más frecuente es la cromosómica (natural). Es debida a la incapacidad de penetración del antibiótico en el interior de la bacteria al carecer ésta de los sistemas de transporte del L- α -glicerol-fosfato y la D-glucosa 6-fosfato. Otro tipo de resistencia de localización cromosómica se manifiesta por la producción de una enzima constitutiva (fosfomicina-glutation-S transferasa) inactivante del antibiótico, localizada en el espacio periplásmico, al producir una unión entre el glutatión y la fosfomicina. Este tipo de resistencia se ha descrito tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. La resistencia plasmídica es de localización extracromosómica y actúa induciendo la conjugación de fosfomicina con ácido glucorónico dando lugar a un compuesto inactivo. Otro mecanismo de resistencia descrito, aunque raro, es la inactivación de la fosfomicina por apertura del enlace de la molécula de fosfomicina entre el carbono y el fósforo por la enzima C-P-liasa (Cordiés y col., 1998; Gobernado, 2003).

La fosfomicina es un antibiótico de elección para el tratamiento de la gastroenterocolitis causada por microorganismos patógenos invasores como lo son *Campylobacter*, *Shigella*, *Salmonella* y *E. coli* (Fukuyama y col., 2001; Gobernado, 2003).

2. 1. 8. 4. 3. Inhibidores de la síntesis de proteínas

Algunos antibióticos tales como el cloranfenicol, aminoglucósidos (estreptomina), macrólidos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina) y las tetraciclinas (clortetraciclina y tetraciclina) son capaces de inhibir la síntesis de las proteínas en las bacterias. El antibiótico se une a los ribosomas bacterianos (que constan de 2 subunidades denominadas 30S y 50S) bloqueando la acción del ARNm, este bloqueo en ocasiones es reversible. En el caso de los aminoglucósidos y tetraciclinas se unen a la subunidad ribosomal 30S y producen la acumulación de complejos iniciales de la síntesis proteica, lectura errónea del código ARNm y producción de polipéptidos anormales que se comportan como bactericidas (Cordiés y col., 1998).

Cicloheximida: Otros nombres que recibe son: naramycin a, hizarocin, actispray y/o kaken. Se obtiene a partir de *Streptomyces griseus*, activo contra organismos eucariotas, sobre los que actúa uniéndose a los ribosomas e impidiendo la síntesis proteica, específicamente interfiriendo en la actividad peptidiltransferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional. Tiene un uso extendido en la investigación biomédica por inhibir la síntesis de proteínas en células eucariotas *in vitro*, ya que su costo es bajo y actúa rápidamente, siendo sus efectos revertidos al quitarla del medio de cultivo, pero dado los importantes efectos tóxicos, incluyendo daño al ADN, teratogénesis y otros efectos en la reproducción, tales como enfermedades congénitas y toxicidad para los espermatozoides no es apta para utilizarla en humanos como antibiótico. Ha sido empleada en la agricultura como un fungicida, aunque su uso está mermando debido a que presenta altos riesgos para la salud (Tremaine y Mills, 1987; Lou y Xu, 1997).

Lincosaminas.

La lincomicina junto a la clindamicina pertenece a las lincosaminas, que a su vez son un subgrupo de los macrólidos. Están constituidas por un ácido aminado (metilprolina) y un

azúcar (piranosa) unidos por una amida. En la clindamicina se sustituye el hidroxilo en posición 7 por un átomo de cloro; pueden actuar como bacteriostáticos o bactericidas, dependiendo de la concentración del fármaco que se alcance en el sitio de infección y de la susceptibilidad del microorganismo infectante (Escolar y col., 1998a).

Estos fármacos ejercen sus efectos mediante la unión a la subunidad ribosomal 50S. Esta unión inhibe la síntesis de proteínas bacterianas. Este mecanismo de acción de las lincomicinas es compartido por otros grupos de antibióticos como los fenicoles (cloranfenicol) y los macrólidos (eritromicina, claritromicina y azitromicina) (Czeizel y col., 2000).

La lincomicina fue el primer antibiótico que se descubrió de este grupo; se obtuvo a partir de cultivos de *Streptomyces lincolnensis*. La clindamicina es un derivado sintético de la lincomicina, difiere estructuralmente de este compuesto por la sustitución de un átomo de cloro por un grupo hidroxilo y la inversión del carbono en la posición 7 involucrado. Por su mayor actividad, mejor absorción por vía gastrointestinal y espectro más amplio, sustituyó a la anterior en la práctica clínica (Czeizel y col., 2000).

Clindamicina: Es un agente bacteriostático aunque se ha demostrado su acción bactericida contra algunas cepas de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Bacteroides*, activo contra la mayoría de las bacterias Gram positivas, incluyendo especies anaerobias y anaerobias facultativas (Walter y col., 2004).

Mecanismo de acción: Actúa inhibiendo la síntesis proteica al unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano (siendo la misma para macrólidos y cloranfenicol) impidiendo la iniciación de la cadena peptídica, inhibiendo sus acciones por competencia al alterar las moléculas de superficie. Facilita la fagocitosis y muerte intracelular de bacterias, incluso en concentraciones subinhibitorias. La concentración mínima inhibitoria (CMI) para la mayoría de las bacterias anaerobias susceptibles es de 0.1-4 µg/mL (Lell y Kremsner, 2002).

La clindamicina tiene espectro similar al de la penicilina y eritromicina, sin embargo, la acción contra anaerobios se considera mejor que la de la penicilina, el cloranfenicol, el metronidazol o la rifampicina, ya que ejerce un efecto postantibiótico duradero contra algunas bacterias susceptibles, quizá por la persistencia del fármaco en el sitio de unión ribosómica (Dhawan y Thadepalli, 1982).

Mecanismo de resistencia: Es parecido al de los macrólidos. Se debe fundamentalmente a la alteración del sitio "blanco". Se ha observado resistencia transferible mediada por plásmidos en *B. fragilis*. En raros casos los cocos Gram positivos pueden inactivar la clindamicina por mecanismos enzimáticos, hecho que parece no tener importancia clínica (Leclercq, 2002).

Fenicoles.

Bajo esta denominación se incluyen dos fármacos: cloranfenicol y tianfenicol. Químicamente ambos son derivados del ácido dicloroacético, con un grupo propanodiol que les confiere actividad antiinfecciosa, una cadena dicloroacetamida y un grupo benceno. Mientras que cloranfenicol tiene un grupo nitro en posición "para" del anillo benzénico, tianfenicol posee un grupo sulfometil (Escolar y col., 1998b).

Cloranfenicol: Es el primer antibiótico de amplio espectro descubierto y utilizado en medicina. Fue aislado de una cepa de *Streptomyces venezuelae* encontrada en el suelo de Venezuela en 1947. En la actualidad se obtiene sintéticamente (Escolar y col., 1998b).

Este antibiótico es de primera elección en (Brooks y col., 2005):

- Salmonelosis sintomáticas, por ejemplo fiebre tifoidea
- Infecciones con cepas de *H. influenzae* productoras de β -lactamasas
- Infecciones meningocócicas en individuos hipersensibles a la penicilina
- Infecciones anaerobias o mixtas en el SNC, por ejemplo, absceso cerebral
- Infecciones graves por rickettsias, como sustituto de tetraciclinas.

Mecanismo de acción: Tras penetrar por difusión facilitada en el citoplasma bacteriano actúan bloqueando la parte terminal de los sustratos amino-acil-ARN-transportadores al sitio aceptor de la peptidiltransferasa de la subunidad 50S ribosomal, con lo cual se impide la elongación de la cadena peptídica bloqueándose la síntesis proteica bacteriana. La exposición de este antibiótico da lugar al cese de la síntesis de proteínas pero no a la de ácidos nucleicos, con lo cual el efecto conseguido es bacteriostático al inhibirse la multiplicación bacteriana. Es posible que cloranfenicol inhiba también la síntesis proteica en células eucariotas, lo cual explicaría la toxicidad producida por estos fármacos (Yunis, 1989).

Mecanismo de resistencia: Los mecanismos de resistencia bacteriana a cloranfenicol pueden ser de dos tipos. El más importante es la producción de enzimas inactivadoras, y en concreto de acetiltransferasas, que actúan acetilando la molécula del antibiótico, impidiendo así la unión de éstas a los ribosomas bacterianos. Este mecanismo de resistencia es extracromosómico y está mediado por plásmidos constitutivos en el caso de algunos bacilos Gram negativos como *E. coli* y *Proteus mirabilis*, e inducibles en el de los cocos Gram positivos. El otro mecanismo de resistencia es de tipo cromosómico y se produce por mutaciones que dan lugar a impermeabilidad de la pared bacteriana a la difusión de estos antibióticos. Este mecanismo ha sido descrito en *E. coli* y *Pseudomonas* (Azemun y col., 1981).

Macrólidos.

Antibióticos naturales, semisintéticos y sintéticos, ocupan un lugar destacado en el tratamiento de infecciones por bacterias intracelulares (Zuckerman y Kaye, 1995).

A partir de *Streptomyces erythreus* se obtuvo eritromicina, que es el antibiótico tipo de este grupo. De diferentes especies de *Streptomyces* se obtuvieron otros antibióticos: roxitromicina, claritromicina, josamicina, kitamicina, azitromicina y espiramicina, derivados semisintéticos de la eritromicina, con modificaciones estructurales que mejoran la penetración tisular y amplían el espectro de actividad. La estructura química de los macrólidos se compone de un anillo lactónico macrocíclico unido por un enlace glucosídico a diversos desoxiazúcares aminados (Alvarez-Elcoro y Enzler, 1999).

Mecanismo de acción: Actúan inhibiendo la síntesis proteica de los microorganismos sensibles, al unirse reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. No se unen a ribosomas de células de mamíferos. Al igual que otros antibióticos que inhiben la síntesis proteica son generalmente bacteriostáticos. Sin embargo, pueden ser bactericidas dependiendo del microorganismo, de las concentraciones del antibiótico y del tiempo de exposición. Se concentran dentro de macrófagos y polimorfonucleares, lo que resulta favorable para el tratamiento de infecciones producidas por patógenos intracelulares. Todos los fármacos de esta familia producen un efecto post-antibiótico prolongado (Zuckerman y Kaye, 1995).

Mecanismo de resistencia: Han sido descritos diversos mecanismos de resistencia por Weisblum (1995).

- Impermeabilidad de la pared celular: Se observa por ejemplo en enterobacterias y *Pseudomonas* spp.
- Eflujo o bombeo activo del antibiótico al exterior: Puede ser de origen plasmídico.
- Inactivación del antibiótico: Se ha observado en bacilos Gram negativos, se da mediante enzimas bacterianas que hidrolizan el anillo lactónico.
- Alteración en el sitio de unión del antibiótico: El cambio de un sólo aminoácido a nivel de la proteína blanco del ribosoma determina una disminución de la afinidad para eritromicina y a menudo también para otros macrólidos y lincosaminas. Este tipo de resistencia se debe a una mutación y ha sido demostrado en *S. pyogenes*, *S. aureus* y *Campylobacter* spp. La resistencia denominada MLS se debe a alteraciones en el ARN y afecta tanto a macrólidos, lincosamidas y streptograminas. Puede ser constitutiva (toda la población la expresa) o inducible, se expresa al exponer a las bacterias a concentraciones subinhibitorias de la droga.

Eritromicina: La actividad de eritromicina aumenta en un pH alcalino, en concentraciones de 0.1 a 2 µg/mL es activa contra microorganismos Gram positivos, incluyendo neumococos, estreptococos y corinebacterias. *Mycoplasma*, *Chlamydia trachomatis*, *Legionella pneumophila* y *Campylobacter jejuni* son susceptibles

también. Las eritromicinas pueden ser medicamentos de elección en infecciones por los microorganismos mencionados y sustituyen a las penicilinas en personas hipersensibles a éstas (Brooks y col., 2005).

Mecanismo de acción: Son bacteriostáticas que actúan a nivel del ribosoma bacteriano, interfiriendo con la síntesis proteica. Para ejercer su acción deben cumplirse al menos dos etapas (Weisblum, 1995):

Ingreso a la célula bacteriana, mediante mecanismo de difusión pasiva y activa. La difusión pasiva ocurre a través de poros hidrofílicos ubicados en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. La difusión activa ocurre a través de una bomba de membrana que requiere energía. Algunas tetraciclinas (doxiciclina, minociclina) ingresan con mayor facilidad al citoplasma, debido a su naturaleza lipofílica.

Una vez en el citoplasma, el antibiótico, al igual que los aminoglucósidos, se une al sitio 50S del ribosoma bacteriano e impide la unión del ARN al sitio receptor del ribosoma. Con ello se evita la adición de aminoácidos a la cadena peptídica en formación. En las células de mamíferos no se encuentra el mecanismo de transporte activo al interior de las mismas y son necesarias concentraciones muy elevadas del antibiótico para inhibir la síntesis proteica en la célula eucariota.

Mecanismos de resistencia: El mecanismo principal de resistencia es la disminución del ingreso del antibiótico a la célula. En general es plasmídico e inducible, es decir, que emergen cepas resistentes luego de ser expuestas a eritromicina. Además estos plásmidos son fácilmente transferibles entre las bacterias. Otro tipo de resistencia resulta de una alteración (metilación) del receptor del ARNr, este se encuentra bajo el control de un plásmido transmitible. La resistencia a uno de los compuestos suele acompañarse de resistencia a todos los de la familia (Escolar y col., 1998a).

Aminoglucósidos.

Fueron aislados a partir de una cepa de *Streptomyces griseus*. La estreptomina fue el primer antimicrobiano activo frente a *Mycobacterium tuberculosis*. A partir de otras

especies de *Streptomyces* posteriormente se obtuvieron neomicina y kanamicina. Para mejorar la actividad antibacteriana y disminuir la toxicidad se continuó investigando y así surgieron: tobramicina, amikacina, dibekacina y netilmicina que son semisintéticos, excepto el primero (Edson y Terrell, 1999).

Los aminoglucósidos son una familia de antibióticos bactericidas, activos frente a enterobacterias y otros Gram negativos aerobios. La estructura química fundamental consiste en un anillo aminociclitol al cual se unen dos o más azúcares, con o sin grupo amino, por medio de enlaces glucosídicos u oxídicos (Begg y Barcgat, 1995).

Mecanismo de acción: Todos los aminoglucósidos son más activos en pH alcalino que en pH ácido. Para ejercer su acción deben ingresar en la célula bacteriana, esto ocurre por un mecanismo de transporte activo, en 2 etapas (Delgado, 1990):

- En la primera, el ingreso depende del potencial transmembrana generado por el metabolismo aerobio.
- La segunda fase de ingreso se ve favorecida por la unión previa del aminoglucósido al ribosoma. Ciertas condiciones que reducen el potencial eléctrico de la membrana como anaerobiosis o el bajo pH del medio disminuyen el ingreso de estos compuestos al citoplasma bacteriano.

Una vez dentro de la célula, los aminoglucósidos se unen de manera irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Esta unión interfiere con la elongación de la cadena peptídica. Los sitios de unión de gentamicina, kanamicina y tobramicina son diferentes a los de estreptomina, por lo que no puede observarse resistencia cruzada entre estos grupos. Este no sería el único modo de acción de los aminoglucósidos, puesto que otros antibióticos que inhiben la síntesis proteica, como tetraciclina y cloranfenicol, tienen sólo efecto bacteriostático. Se ha sugerido que el proceso de penetración del aminoglucósido altera la estructura de la membrana citoplasmática originando un deterioro progresivo con salida de componentes intracelulares y alteraciones del metabolismo que explicarían el efecto bactericida rápido de estos antibióticos (Delgado, 1990).

Mecanismos de resistencia: La resistencia adquirida a los aminoglucósidos se debe a 3 mecanismos básicos (Honore y Cole, 1994):

- Presencia de enzimas que modifican aminoglucósidos: Es el mecanismo más común y ha sido detectado en diferentes bacilos Gram negativos, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp. Se trata de diversas enzimas (acetilasas, adenilasas y fosfatasas) que modifican grupos sustituyentes de la molécula, lo que resulta en un compuesto de baja afinidad por el ribosoma bacteriano. Además no ocurre la segunda fase de ingreso del antibiótico a la célula. Los genes que codifican estas enzimas en general se encuentran en plásmidos, lo que permite la transferencia de los mismos a otra bacteria.
- Alteraciones en los sitios de unión: Se debe a mutaciones en los genes que codifican los sitios de unión a estos antibióticos. Es un mecanismo poco frecuente y ha sido hallado en *E. coli* y *N. gonorrhoeae*.
- Disminución del ingreso: Determinado por alteraciones a nivel de la membrana externa para el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, que dificultan la entrada del antibiótico a la bacteria.

Estreptomina: Aminoglucósido descubierto en 1940, se obtiene del *Streptomyces griseus*. Se estudió detalladamente y llegó a ser el prototipo de esta clase de medicamentos. Inhibe la síntesis proteica de las bacterias insertándose y bloqueando la función de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. (Brooks y col., 2005).

La resistencia está basada en (Brooks y col., 2005):

- Deficiencia del receptor ribosómico (mutante cromosómico).
- Destrucción enzimática del antibiótico (resistencia transmisible mediada por el plásmido).
- Falta de la permeabilidad a la molécula del antibiótico y falta del transporte activo hacia el interior de la célula.
- Puede ser cromosómico (por ejemplo, los estreptococos son relativamente impermeables a los aminoglucósidos).

Las bacterias anaerobias a menudo son resistentes a estreptomina debido a que el transporte a través de la membrana celular es un proceso que requiere energía y que depende del consumo de oxígeno (Brooks y col., 2005).

Tetraciclinas.

Clortetraciclina y tetraciclina: El descubrimiento de la primer tetraciclina tuvo lugar en 1945. Fue aislada de una cepa de *Streptomyces aureofaciens*, y recibió por ello el nombre de aureomicina, fármaco al que actualmente se denomina clortetraciclina. El segundo componente del grupo fue aislado a partir de una cepa mutante de *Streptomyces* y se denominó demeclociclina (Escolar y col., 1998b).

La suma de diferentes grupos funcionales ha dado lugar a numerosos compuestos que pueden agruparse en generaciones según el orden de su descubrimiento. Constituyen una familia de productos naturales o de primera generación (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina y demeclociclina) y semisintéticos formando las tetraciclinas de segunda generación (metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina y tigeciclina) derivados de diferentes especies de *Streptomyces* spp., que actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas. Son agentes básicamente bacteriostáticos, con actividad frente a cocos Gram positivos y Gram negativos aerobios y anaerobios, bacilos Gram positivos y bacilos Gram negativos, por lo que se han convertido en antibióticos de uso habitual en seres humanos, en animales y en algunas áreas de la agricultura (Chopra y Roberts, 2001).

Todas poseen un núcleo de estructura tetracíclica líneal compuesta de cuatro anillos fusionados, de ahí su denominación (Pérez-Trallero e Iglesias, 2003).

Mecanismo de acción: Las tetraciclinas son capaces de atravesar la membrana externa formando porinas que permiten la salida de las estructuras internas de la bacteria, y mediante difusión pasiva llegan al citoplasma gracias a un mecanismo dependiente de energía. Dentro del citoplasma se unen al ribosoma inhibiendo la síntesis de las proteínas. Este efecto se produce evitando la unión del sitio aminoacil del ARN de transferencia (aminoacil ARN-transfer) a la subunidad 30S ribosomal. La asociación es

reversible, lo cual explicaría su efecto bacteriostático. Además, tienen la propiedad de quelar los cationes divalentes metálicos como el hierro, el calcio y el magnesio, impidiendo que este último actúe en la unión de las dos subunidades del ribosoma durante la síntesis proteica. Así mismo inhiben dos sistemas enzimáticos bacterianos como la fosforilación oxidativa y la cadena oxidativa de la glucosa. Por último la ausencia de actividad anticélulas eucariotas da lugar a las propiedades antimicrobianas selectivas de las tetraciclinas (Barthélémy y col., 1984; Pérez-Trallero e Iglesias, 2003).

Mecanismo de resistencia: Puede ser natural o adquirida. Un mecanismo responsable de la resistencia bacteriana a las tetraciclinas es la disminución o pérdida de la permeabilidad celular, por una alteración del sistema de transporte activo a lo que se suma un cierto bombeo del antibiótico hasta el exterior. Otro mecanismo frecuentemente involucrado en la resistencia adquirida se debe a proteínas de protección ribosomal que permiten actuar al aminoacil ARN-transfer en presencia de concentraciones de antibiótico que normalmente inhibirían la síntesis de éstas. Es posible que determinadas bacterias (como *Propionibacterium* spp.) adquieran resistencia mediante mutaciones en el ARNr (Ross y col., 2001).

También se ha observado, de forma excepcional, resistencia a tetraciclinas mediante inactivación enzimática en algunas bacterias anaerobias. Tanto el bombeo activo como la protección de la inhibición del ribosoma son mecanismos de resistencia clínicamente relevantes y ambas suelen estar relacionados con la adquisición de elementos móviles de resistencia (Chopra y Roberts, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN

El empleo de antibióticos como medio terapéutico o profiláctico contra enfermedades (particularmente de las localizadas en la mama) en ganado lechero, se ha convertido en un gran problema, ya que el paso de residuos a la leche es endógeno; y se ha comprobado que la mayor parte de los preparados farmacológicos administrados a las hembras lactantes se segregan con la leche.

Los residuos de antibióticos en la leche, son de gran importancia por las acciones biológicas que éstos producen en la salud del consumidor (alergias, alteración de la flora intestinal, aparición de flora resistente, etc.), además de tener repercusiones tecnológicas importantes en la industria láctea como es la inhibición de cultivos iniciadores utilizados en la manufactura de productos lácteos, así como provocar otros efectos indeseables en quesos y productos fermentados (demora en la acidificación, coagulación deficiente, disminución de la retención de agua, etc.).

Diversos métodos basados en técnicas fisicoquímicas han sido empleados para detectar residuos de antibióticos en leche, su aplicación depende básicamente de los recursos económicos, debido fundamentalmente a sus elevados costos, además de ser lentos, por lo que son de poca utilidad práctica. Por otra parte el empleo de las BAL como método microbiológico tiene la ventaja de implementarse fácilmente, poseer bajos costos y otorgar una adecuada confiabilidad en análisis de rutina.

Por otro lado, las BAL no susceptibles a antibióticos pueden ser empleadas como cultivos iniciadores en la industria alimenticia, ya que las especies de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* a las que se les probará su susceptibilidad son frecuentemente usados en gran escala por ejemplo en la producción de lácteos fermentados y embutidos o como probióticos.

4. OBJETIVOS

4. 1. Objetivo general:

Analizar *in vitro* la susceptibilidad de cepas de BAL bacteriocinogénicas aisladas de quesos artesanales elaborados en el estado de Hidalgo frente a 12 diferentes antibióticos a 4 distintas concentraciones, para su posible uso como indicadores de la presencia de residuos de antibióticos y/o como cultivos iniciadores en la industria alimenticia.

4. 2. Objetivos específicos:

- Realizar pruebas bioquímicas, examinar características morfológicas y fisiológicas de los cultivos de BAL para verificar su pureza.
- Evaluar la susceptibilidad de BAL frente antibióticos inhibidores de la síntesis de pared celular, inhibidores de la síntesis de proteínas y un inhibidor de la síntesis de ADN a concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 $\mu\text{g/mL}$.
- Identificar las cepas de BAL que presenten mayor y menor susceptibilidad a los antibióticos a evaluar.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5. 1. Material de uso general

Agitador magnético

Asas para siembra de platino

Cajas petri estériles desechables de 100 x 15 cm. Laboratorios SYM S.A. de C. V.

Espátulas

Frascos PYREX con tapón 500 y 1000 mL

Gradillas para tubo de 16 x 150 NALGENE^R

Horador 5 mm diámetro

Mecheros Bunsen y Fisher

Microtubo Eppendorf 1.5 mL

Portaobjetos Corning 26 x 76 mm

Probetas graduadas de 100 y 500 mL NALGENE^R

Puntas para micropipetas 200 µL Eppendorf

Termómetro -30 a 50°C LAUKA Mod. 520

Tubos de ensaye con tapón de rosca 16 x 150 PYREX^R

Vernier Starrett^R

5. 2. Equipo de laboratorio

Autoclave Felisa Mod. FE-399

Balanza Analítica Explorer OHAUS^R Mod. EO4130

Balanza Digital Explorer OHAUS^R Mod. EOH110

Campana de flujo laminar LABCONCO CORPORATION Mod. 36208-04

Cuenta colonias DARKFIELD QUEBEC Mod. 3325 American Optical

Incubadora bacteriológica blue M Electric company Mod. 100^a

Micropipeta BIOHIT Proline^R 100-1000 µL Mod. AU21456

Micropipeta BIOHIT Proline^R 20-200 µL Mod. AU19764

Micropipeta Eppendorf^R 2-20 µL Mod. 2-20 µL

Micropipeta Oxford^R 200 µL-1 mL

Microscopio Motic^R Mod. SFC-28 Instrumentos Ópticos de Precisión S.A. de C.V.

Vortex 2 Genie Mod. G-560 Scientific Industries

5. 3. Reactivos

Aceite de inmersión

Agua oxigenada al 30 %

Alcohol etílico 96° G. L. sin desnaturalizar grado reactivo

Alcohol-acetona 70:30 (v/v)

Cristal violeta

Reactivo de la oxidasa BBL™ Oxidasa Becton Dickinson

Lugol

Safranina

Solución desinfectante alcohol-agua 70:30 (v/v)

5. 4. Medios de cultivo

Caldo MRS Difco™	Agar MRS Difco™
Fórmula aproximada por litro*	Fórmula aproximada por litro*
Peptona de proteasa no.3 10.0 g	Peptona de proteasa no.3..... 10.0 g
Extracto de res..... 10.0 g	Extracto de res..... 10.0 g
Extracto de levadura..... 5.0 g	Extracto de levadura..... 5.0 g
Dextrosa..... 20.0 g	Dextrosa..... 20.0 g
Polisorbato 80..... 1.0 g	Polisorbato 80..... 1.0 g
Citrato de amonio..... 2.0 g	Citrato de amonio..... 2.0 g
Acetato de sodio..... 5.0 g	Acetato de sodio..... 5.0 g
Sulfato de magnesio..... 0.1 g	Sulfato de magnesio..... 0.1 g
Sulfato de manganeso..... 0.05 g	Sulfato de manganeso..... 0.05 g
Fosfato dipotásico..... 2.0 g	Fosfato dipotásico..... 2.0 g
	Agar..... 15.0 g
*pH final 6.5 ± 0.2	*pH final 6.5 ± 0.2

Instrucciones: Suspender 55 g en 1 L de agua purificada. Caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 min. Autoclave a 121°C/15 min.

Instrucciones: Suspender 70 g en 1 L de agua purificada. Caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 min. Autoclave a 121°C/15 min.

Agar-Agar DIBICO^R: Agar-Agar purificado exento de inhibidores. Se emplea en la preparación de medios de cultivo microbiológicos.

Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo a las indicaciones de la etiqueta, excepto el agar MRS suave (8 %) que se preparó con caldo MRS y 8 g de agar-agar por litro.

5. 5. Antibióticos

Inhibidor de la síntesis de DNA	Inhibidores de la síntesis de la pared celular	Inhibidores de la síntesis de proteínas
Metronidazol 500 mg Importadora y manufacturera Bruluart S.A.	Amoxicilina 500 mg Bruluagsa S.A. de C.V.	Cicloheximida 500 mg Sigma Chemical CO.
	Ampicilina 500 mg Laboratorios Pisa S.A. de C.V.	Clindamicina 500 mg Laboratorios Pisa S.A. de C.V.
	Fosfomicina 500 mg Laboratorios Senosiain S.A. de C.V.	Cloranfenicol 500 mg Importadora y manufacturera Bruluart S.A.
	Penicilina V 800,000 U Productos Maver S.A. de C.V.	Clortetraciclina 500 mg Sigma Chemical CO.
		Eritromicina 250 mg Laboratorios Solfran S.A.
		Estreptomina 500 mg Sigma Chemical CO.
		Tetraciclina 250 mg Laboratorios Solfran S.A.

5. 5. 1. Preparación de antibióticos

En base a estos antibióticos se prepararon soluciones primarias y a partir de estas, se hicieron concentraciones decrecientes: disolviendo el antibiótico a ensayar (500 mg) en 50 mL de agua destilada, obteniendo así una concentración de 10 mg/mL, de ésta solución se tomó 1 mL y se llevó a un volumen de 10 mL (1000 µg/mL), a partir de esta concentración se realizaron 3 diluciones más, tomando en cada una 100 µL y llevándolos a 1 mL, para obtener concentraciones de 100, 10 y 1 µg/mL respectivamente.

5. 6. Material biológico

5. 6. 1. Cepas de BAL empleadas

Las 20 BAL empleadas (Tabla 5) forman parte de un banco de cepas conservadas por congelación, empleando un agente crioprotector (glicerol 15-20%). Estas cepas fueron aisladas de quesos artesanales elaborados en el Estado de Hidalgo (Clavel, 2006), identificadas bioquímicamente con el sistema miniaturizado API 50CHL (Ortíz, 2006) e

identificadas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación (García, 2007) a las cuales se les determinó su actividad inhibitoria frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos (Ramírez, 2005; Neria, 2006).

Tabla 5. Origen de las BAL empleadas.

Lactobacillus		Origen
0110	<i>Lb. plantarum</i>	Queso panela Tulancingo
0508	<i>Lb. plantarum</i>	Leche Atotonilco
1509	<i>Lb. plantarum</i>	Queso Oaxaca Actopan
1607	<i>Lb. plantarum</i>	Queso Oaxaca Tulancingo
1803	<i>Lb. plantarum</i>	Queso Oaxaca Actopan
2102	<i>Lb. plantarum</i>	Queso Manchego Jaltepec
0506	<i>Lb. pentosus</i>	Leche Atotonilco
2306	<i>Lb. rhamnosus</i>	Queso Oaxaca Singuilucan
Leuconostoc		
0104	<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>	Queso panela Tulancingo
0209	<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>	Queso Oaxaca Tulancingo
1801	<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>	Queso Oaxaca Actopan
1802	<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>	Queso Oaxaca Actopan
2106	<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i>	Queso Manchego Jaltepec
2509	<i>Leuc. pseudomesenteroides</i>	Queso Oaxaca Tezontepec
2510	<i>Leuc. pseudomesenteroides</i>	Queso Oaxaca Tezontepec
Lactococcus		
0103	<i>Lc. lactis</i>	Queso panela Tulancingo
0603	<i>Lc. lactis</i>	Queso Oaxaca Actopan
0605	<i>Lc. lactis</i>	Queso Oaxaca Actopan
0107	<i>Lc. raffinolactis</i>	Queso panela Tulancingo
1807	<i>Lc. raffinolactis</i>	Queso Oaxaca Actopan

5. 6. 2. Acondicionamiento de las BAL

Las cepas fueron descongeladas e inoculadas en 9 mL de caldo MRS, incubándose a 30°C por 18 h repitiendo al día siguiente la misma operación para obtener una concentración aproximada de 10⁷ufc/mL.

5. 6. 3. Pruebas para verificar pureza de las BAL

Se tomó una asada del cultivo acondicionado y se sembró por estría en cajas petri con agar MRS. Se incubaron a 30°C por 24 h con el propósito de aislar colonias y examinar sus características morfológicas y fisiológicas (Fig. 4).

5. 6. 3. 1. Tinción de Gram

Se colocó una gota de agua sobre un portaobjetos, se extendió con la ayuda de un asa la colonia de BAL, mezclando uniformemente con el agua. Se fijó la muestra a la flama adicionándole una solución de cristal violeta que la cubriera, dejándola reaccionar por 1 min, se eliminó el exceso para añadirle lugol (1 min). Posteriormente se decoloró con una solución de alcohol-acetona durante 20 s, se lavó con agua y se añadió safranina (1 min), eliminando el exceso de ésta con agua, secando finalmente la muestra al aire. Se observó al microscopio características tales como tipo de tinción y morfología.

5. 6. 3. 2. Prueba de la Catalasa

Se tomó con el asa estéril una colonia de cultivo de 18 a 24 h de incubación. Se colocó la colonia directamente sobre un portaobjetos sin añadir agua agregándole una gota de H₂O₂. La interpretación se realizó observando que no existiera formación de burbujas para considerarlas catalasa negativa, siendo esta una característica propia de las BAL.

5. 6. 3. 3. Prueba de la oxidasa

Se impregnó un trozo de papel filtro de aproximadamente 3 x 3 cm con el reactivo para oxidasa: clorhidrato u oxalato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% (Kovacs). Se tomó con el asa de siembra estéril una colonia de la placa, colocándola sobre el sustrato del papel y extendiéndola cuidadosamente. Se esperó 1 min para observar si existía algún cambio de coloración, si esto no ocurriera, al microorganismo se le consideraría oxidasa negativo.

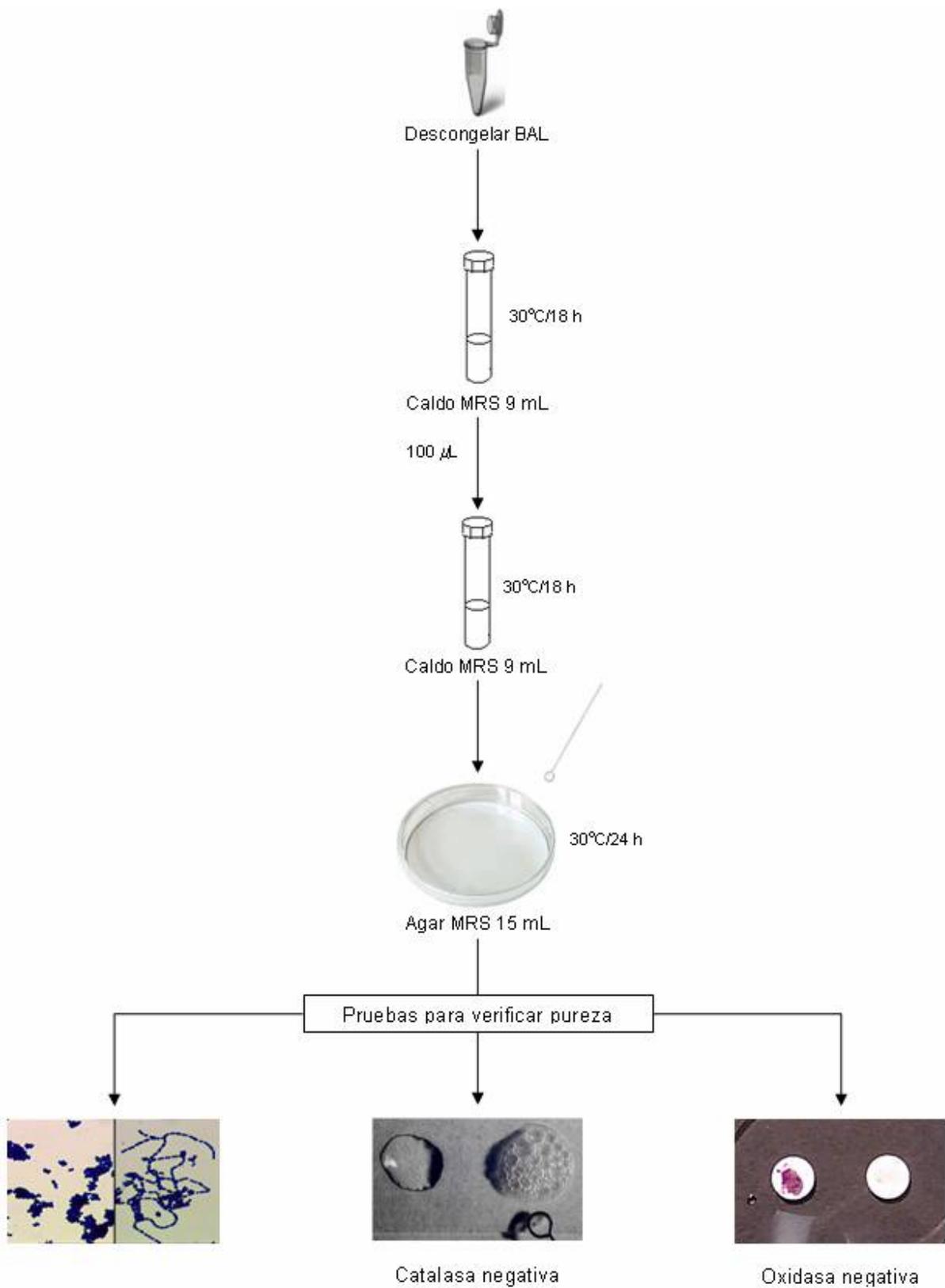


Figura 4. Diagrama de acondicionamiento y pruebas para verificar pureza de BAL.

5. 6. 4. Prueba de susceptibilidad a diversos antibióticos.

Después de comprobar la pureza de las BAL por las técnicas antes descritas, se llevó a cabo por triplicado para cada antibiótico (un ensayo en diferente día) la prueba de susceptibilidad de las BAL por el método de difusión en agar modificado (Fig. 5) por Paik y col. (1997), para lo cual se tomó una colonia de la cepa a ensayar, se sembró en caldo MRS e incubó a 30°C/18 h. Una vez transcurrido este tiempo, se obtuvo un cultivo joven, del cual se tomó un volumen de 20 µL conteniendo una concentración aproximada de 10^6 - 10^7 ufc/mL inoculándose en 10 mL de agar MRS suave (1%). Se homogeneizó y vertió en cajas petri que contenían una capa de agar MRS (15 mL), estas cajas se mantuvieron en refrigeración (4°C/1 h) con el propósito de que la sobrecapa gelificara. Una vez solidificado a estas condiciones, se prepararon 9 pozos equidistantes entre sí (8 para ensayar 2 diferentes antibióticos a 4 concentraciones y 1 como control, al cual sólo se le agregó agua destilada) de 5 mm de diámetro en cada caja con un horador del número 2, removiendo el agar con un asa estéril para colocar 20 µL de cada antibiótico en sus diferentes concentraciones, esto para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se dejó que difundiera por completo en campana de flujo laminar. Finalmente se incubaron a 30°C/24 h.

5. 6. 4. 1. Lectura de los halos de inhibición.

Después de 24 h de incubación cada placa fue examinada visualmente, se midió con un Vernier las zonas inhibidas resultantes para cada concentración, las cuales eran uniformemente circulares, tomando como límite el área donde no se observó crecimiento.

5. 6. 4. 2. Análisis de resultados.

Los valores de los diámetros fueron expresados en mm para cada concentración, se calculó el valor promedio de los tres ensayos, así como también la desviación estándar del promedio.

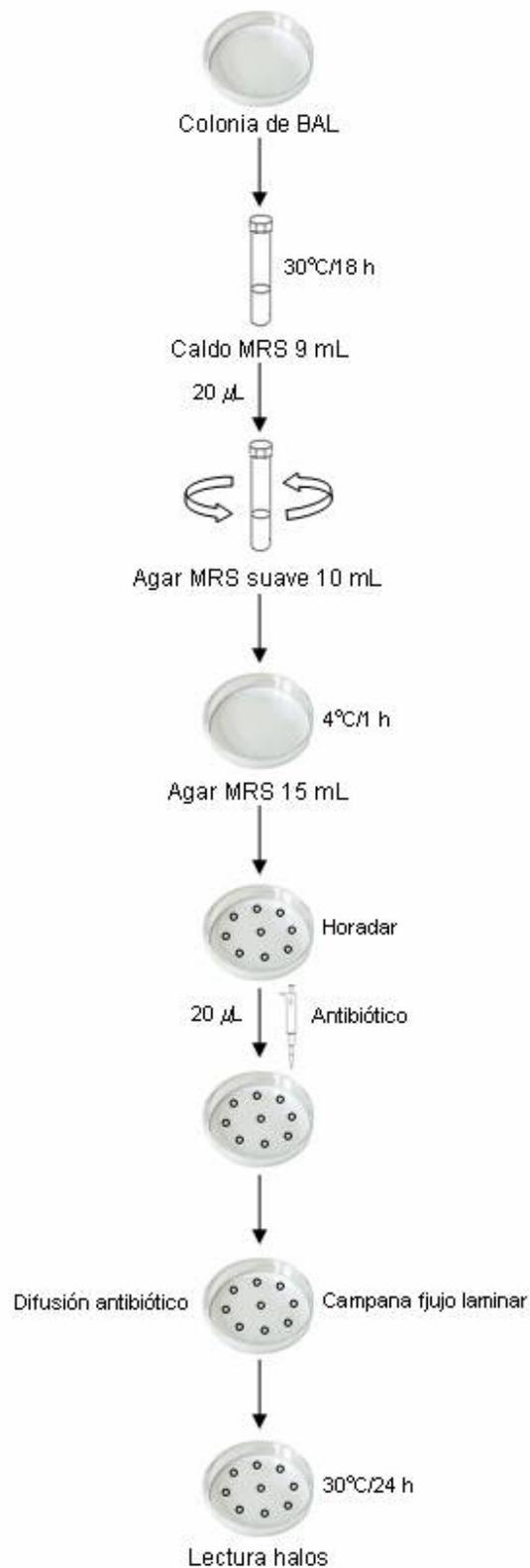


Figura 5. Diagrama para la prueba de susceptibilidad de las BAL a diversos antibióticos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La realización de este trabajo inició con la reactivación en caldo MRS de las cepas de BAL congeladas, las cuales desarrollaron sin problema, ya que este medio de cultivo es empleado para su recuento y aislamiento por ser un medio selectivo, principalmente cuando son aisladas de productos lácteos y fuentes humanas, esto aunado a que el método de conservación por congelación las mantuvo en óptimas condiciones.

Las BAL reactivadas y sembradas por estría en placas de agar MRS, presentaron morfología propia de estos microorganismos, tales como colonias pequeñas, blancas o cremosas, de superficie convexa con forma redonda y bordes enteros, las cuales son características predominantes de estas bacterias (Wood y Holzappel, 1995).

Se realizó tinción de Gram para verificar la pureza de las BAL, las cuales al observarse al microscopio fueron en un 55% bacilos y el restante 45% cocos, siendo todas Gram positivas, mientras que en las pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa resultaron negativas, lo que permitió considerarlas como cultivos puros y libres de cualquier tipo de contaminación para poder así evaluar su susceptibilidad a diferentes antibióticos.

De las cepas ensayadas, el género *Lactobacillus* compuesto por 8 cepas, representó el 40% de las BAL distribuido en 3 diferentes especies (*Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* y *Lb. rhamnosus*); el género *Leuconostoc* (35%) estuvo integrado por 7 cepas de 2 especies (*Leuc. mesenteroides* subesp. *mesenteroides* y *Leuc. pseudomesenteroides*); por otro lado, el género *Lactococcus* (25%) estuvo conformado por 5 cepas pertenecientes a 2 especies (*Lc. lactis* y *Lc. raffinolactis*) (Fig. 6).

Una vez verificada la pureza de los cultivos, se analizó la susceptibilidad frente a diversos antibióticos. Para el análisis de los resultados, la concentración del antibiótico a la cual no hubo crecimiento de las BAL después de su incubación a 30°C/24 h, se definió como la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los valores exactos de las medias y su desviación estándar, así como las CMIs de cada antibiótico y los porcentajes de inhibición por CMI se presentan en los anexos.

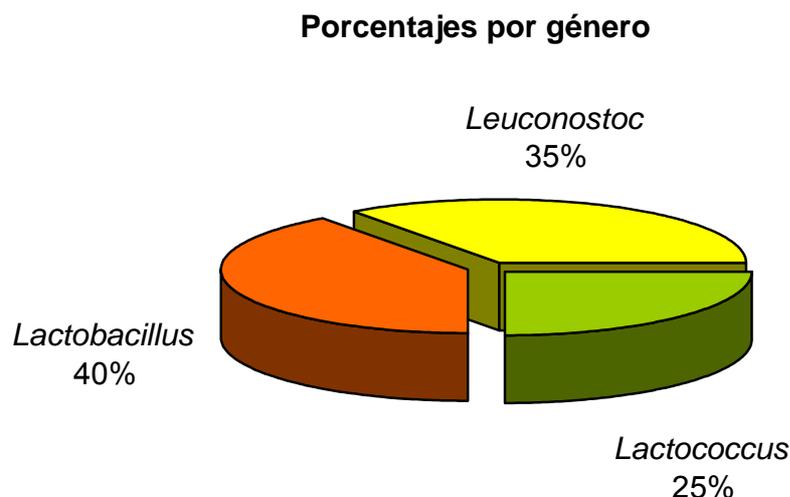


Figura 6. Distribución por género de las cepas de BAL ensayadas

Organizaciones como la FDA y la OMS han legislado y establecido un límite máximo para residuos (LMR) de medicamentos presentes en la leche, con el fin de evitar que sea comercializada a concentraciones por arriba de las permitidas, tratando de evitar riesgos en la salud pública de forma indirecta a personas con hipersensibilidad a ciertos medicamentos.

La FDA (2005) establece un LMR de 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para amoxicilina en leche. Este antibiótico pertenece al grupo de los inhibidores de la síntesis de pared celular, el cual, al ser evaluado en nuestro estudio mostró acción sobre las cepas de *Lactobacillus plantarum* 0110, 0508, 1607 y 1803 así como con la cepa de *Lb. pentosus* 0506, al presentar una CMI de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que *Lb. plantarum* (1509 y 2102) y *Lb. rhamnosus* 2306 tuvieron una CMI de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Estudios realizados por Tankanow y col. (1990) hacen mención que *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. Son considerados por regla general, susceptibles a amoxicilina.

Del grupo de los lactobacilos, *Lb. plantarum* 1607 fue la cepa que mostró mayor susceptibilidad a este antibiótico, al presentar un halo de inhibición de 18.33 ± 3.51 mm.

Esto resulta de gran interés ya que esta especie de *Lactobacillus* se caracteriza por tener un amplio espectro de fermentación y estar presente en leche y quesos como el Cheddar. Otra característica es la producción de una bacteriocina (plantaricina A) por parte de algunas cepas, a la cual se le ha encontrado actividad inhibitoria contra levaduras, bacterias Gram negativas y la mayor parte de las bacterias Gram positivas (Leveau y Bouix, 2000).

Del género *Leuconostoc* las cepas *Leuc. Mesenteroides* subesp. *Mesenteroides* 0104 y 1801 presentaron una CMI de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo la cepa 1801 la que resultó más susceptible de este género al ser inhibida a esta concentración en un diámetro de 16.00 ± 0.00 mm (Fig.7), en tanto que las cepas 0209, 1802 y 2106, así como *Leuc. Pseudomesenteroides* 2509 y 2510 tuvieron una CMI de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Figura 7. *Leuc. Mesenteroides* subesp. *Mesenteroides* 1801, cepa que presentó mayor susceptibilidad frente a amoxicilina con una CMI de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En estudios realizados por Flórez y col. (2005) aislaron 146 cepas de BAL a partir de queso azul elaborado con leche de cabra sin tratamiento térmico, de las cuales 21 correspondían a *Leuc. Mesenteroides* - *Leuc. Pseudomesenteroides*, determinaron la CMI de amoxicilina en un rango de diluciones de 0.25 a 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con los siguientes resultados: 3 a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6 a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Las cepas ensayadas por Flórez y col. (2005), mostraron mayor susceptibilidad a amoxicilina comparadas con las nuestras, ya que 16 de sus cepas fueron inhibidas en un rango de 2-4 $\mu\text{g/mL}$. La alta susceptibilidad presentada por estas cepas se puede encontrar en función de su membrana externa, ya que en las bacterias Gram positivas no es una barrera importante para evitar la penetración de antibióticos. Por otro lado las bacterias pueden presentar cierta tolerancia, que aunque no es un verdadero mecanismo de resistencia se presenta en algunas cepas. Cuando esto acontece, como pudo haber ocurrido en nuestro caso, las bacterias son inhibidas, pero no son lisadas, a no ser que se empleen concentraciones muy elevadas.

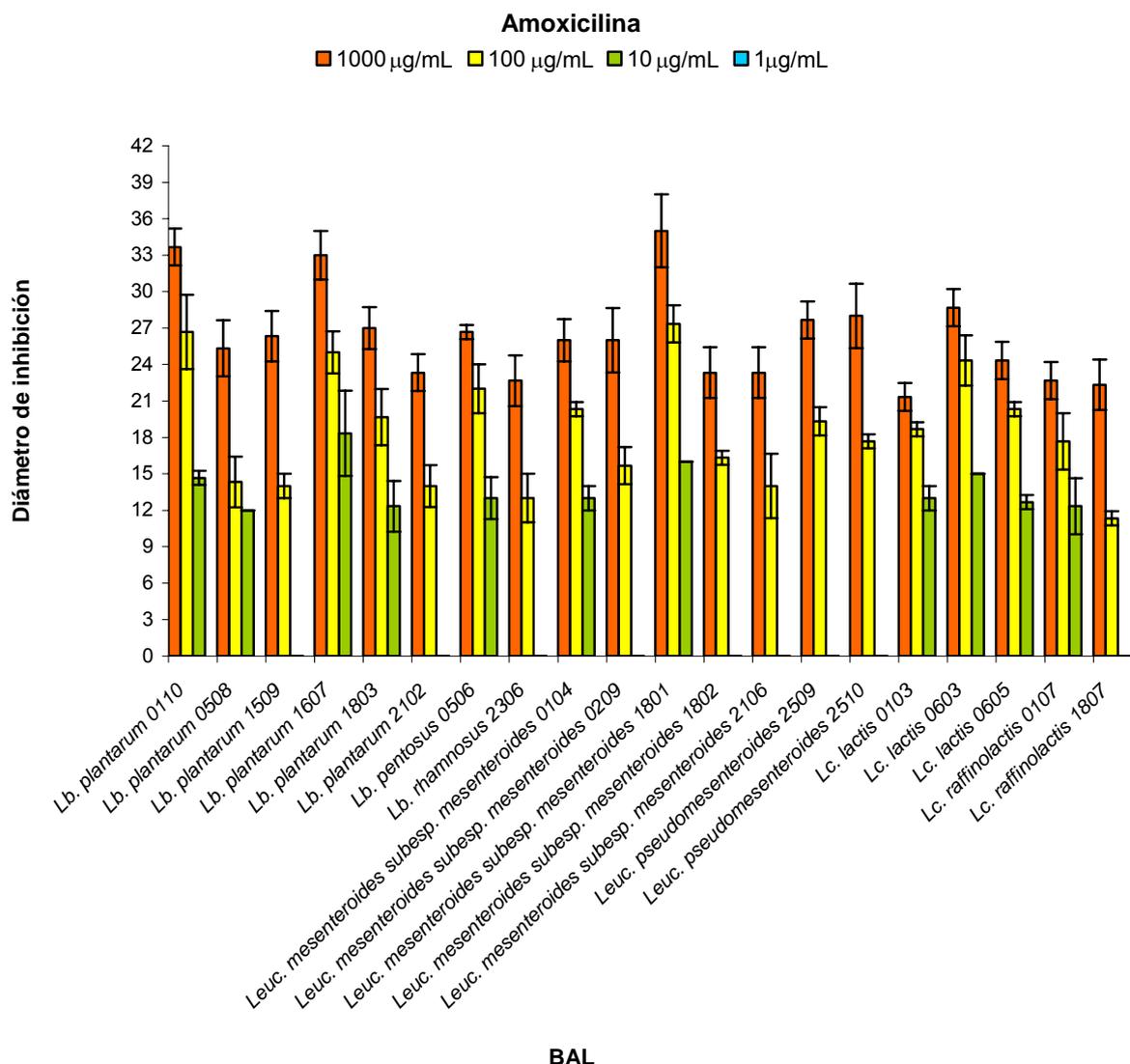
De las siete diferentes especies incluidas en el género *Lactococcus*, *Lc. lactis* subesp. *lactis* y *Lc. lactis* subesp. *cremoris* son de importancia en la industria alimentaria (Carr y col. 2002). Aún cuando *Lc. raffinolactis* no es relevante para este sector, en nuestro estudio se probó su susceptibilidad a los antibióticos ensayados, ya que en trabajos previos realizados por Ramírez (2005) y Neria (2006), las cepas 0107, y 1807 mostraron actividad inhibitoria frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos, así como a microorganismos de importancia en la salud pública, como lo son, *Vibrio fluvialis*, *V. parahemolyticus*, *Salmonella typhimurium* ATCC 6539, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter aerogenes*.

De las cepas ensayadas de *Lactococcus* frente a amoxicilina, la de mayor susceptibilidad fue *Lc. lactis* 0603 al tener un halo de 15.00 ± 0.00 mm con una CMI de 10 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la cepa *Lc. raffinolactis* 1807 fue la más resistente al presentar una CMI de 100 $\mu\text{g/mL}$ para este mismo antibiótico, mostrando un halo de inhibición de 11.33 ± 0.58 mm.

La figura 8 muestra el diámetro de los halos de inhibición para cada una de las cepas a las cuatro diferentes concentraciones ensayadas de amoxicilina.

Los porcentajes para la CMI por género, estuvieron distribuidos de la siguiente forma: *Lactobacillus*: 25% a 10 $\mu\text{g/mL}$ y 15% a 100 $\mu\text{g/mL}$; *Leuconostoc*: 10% a 10 $\mu\text{g/mL}$ y 25% a 100 $\mu\text{g/mL}$; *Lactococcus*: 20% a 10 $\mu\text{g/mL}$ y el 5% a 100 $\mu\text{g/mL}$.

De estos porcentajes, se puede observar que el género *Lactobacillus* fue el más susceptible a la acción de amoxicilina.



BAL

Figura 8. Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a amoxicilina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 µg/mL de amoxicilina y se incubaron a 30°C durante 24 h.

La ampicilina es otro antibiótico que pertenece al grupo de los inhibidores de la síntesis de la pared celular, se utiliza vastamente en veterinaria pues constituye una alternativa eficaz en las patologías infecciosas. Su uso está aprobado por la FDA, estableciendo un LMR de 0.01 µg/mL. La susceptibilidad mostrada por el género *Lactobacillus* hacia este

antimicrobiano con una CMI de 10 $\mu\text{g/mL}$ fue para las cepas *Lb. plantarum* 0110, 0508, 1607, 1803, *Lb. pentosus* 0506 y *Lb. rhamnosus* 2306; mientras que las cepas *Lb. plantarum* 1509 y 2102 presentaron una CMI de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Lb. plantarum 0110 resultó la más susceptible de los lactobacilos, al ser inhibida en un diámetro de 18.67 ± 2.31 mm por la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. En contra parte, *Lb. plantarum* 1509 fue quien mostró mayor resistencia a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ al ser inhibida en un diámetro de 16.67 ± 1.53 mm (Fig. 9).

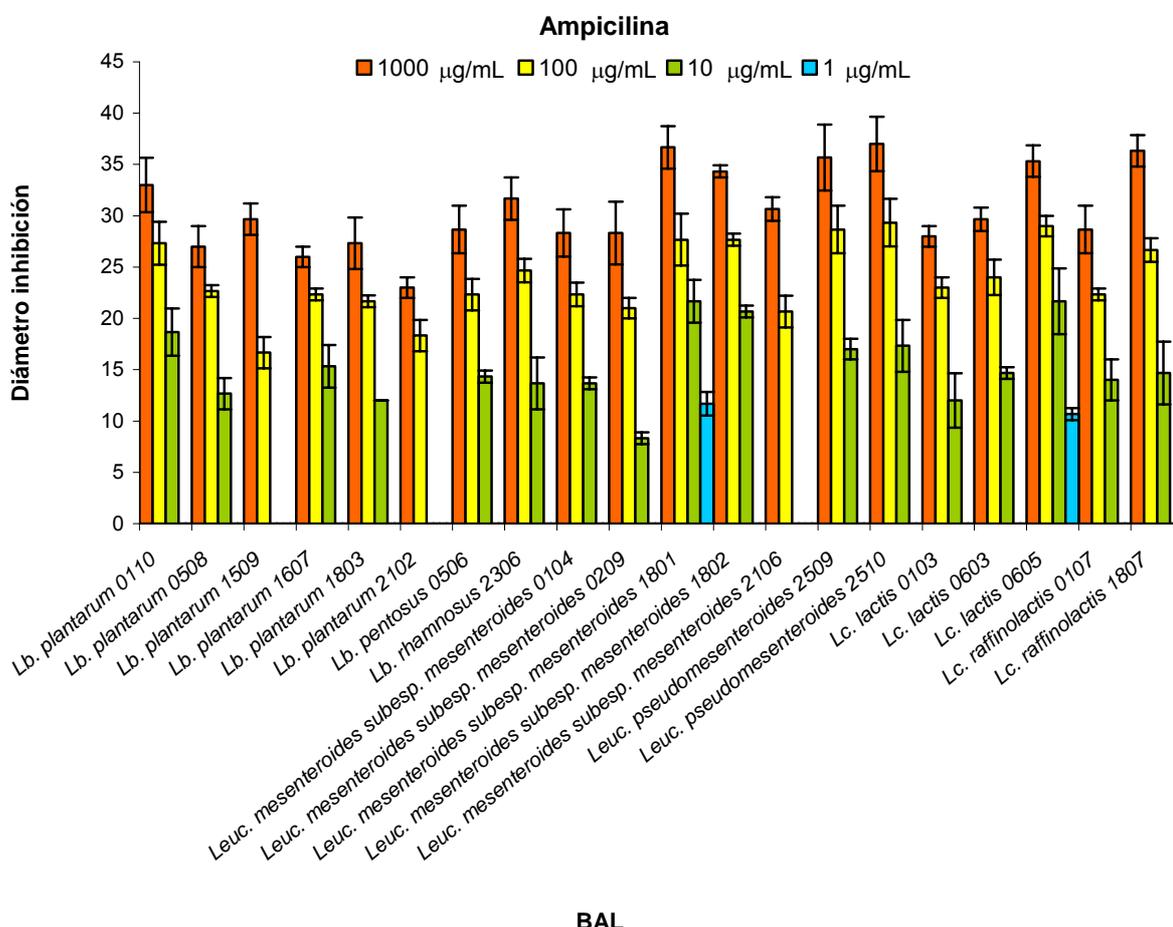


Figura 9. Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a ampicilina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina y se incubaron a 30°C durante 24 h.

Estudios realizados por Mejía y col. (2007) a partir de heces de niños lactantes y muestras vaginales de 10 mujeres (todos ellos sin problemas de salud), aislaron 360 cepas de microorganismos identificando sólo a 22 como lactobacilos, caracterizándolas *in vitro* para determinar su potencial probiótico y al probar su sensibilidad a 10 µg de ampicilina, todas las cepas fueron susceptibles mostrando halos de inhibición entre 12 y 30 mm, concentraciones menores de 0.5 µg no afectaron a ninguna de las cepas. Estos resultados tienen similitud con los nuestros, ya que la concentración de 1 µg/mL no afectó a ninguno de los lactobacilos, por lo que se puede inferir que concentraciones menores no los afectarían. En cambio a partir de la concentración de 10 µg/mL se vio inhibida la mayoría de las cepas de este género, con diámetros de halo que se encuentran dentro del rango de los mencionados por Mejía y col. (2007).

Las cepas *Leuc. Mesenteroides* subesp. *mesenteroides* 0104, 0209, 1802 y *Leuc. Pseudomesenteroides* 2509 y 2510 mostraron una CMI de 10 µg/mL para ampicilina. La cepa *Leuc. Mesenteroides* 2106 fue la más resistente del género al ser inhibida en un diámetro de 20.67 ± 1.53 mm a una CMI de 100 µg/mL. Por el contrario, *Leuc. Mesenteroides* 1801 fue la más susceptible a partir de 1 µg/mL, siendo inhibida en un diámetro de 11.67 ± 1.15 mm.

La importancia de los leuconostocs radica en que se emplean en la producción de vino, en la fermentación de verduras como las coles (chucrut), pepinillos en vinagre, en la manufactura del suero de la leche, mantequilla y queso (Prescott y col. 1999).

Una ventaja del género *Leuconostoc*, al utilizarlo como cultivo iniciador es que funciona en una mezcla de cultivos con *Lactococcus*. La función de los lactococos es producir ácido a partir de la lactosa y el rol de los leuconostocs es fermentar el ácido cítrico de la leche en compuestos volátiles (diacetilo y/o acetoína) (Vedamuthu, 1994).

En lo que respecta al género *Lactococcus*, las cepas *Lc. lactis* 0103, 0603 y *Lc. raffinolactis* 0107 y 1807, presentaron una CMI de 10 µg/mL de ampicilina, en tanto que *Lc. lactis* 0605 fue la que mostró mayor susceptibilidad con un halo de inhibición de 10.67 ± 0.58 mm y una CMI de 1 µg/mL.

Lc. lactis es de gran relevancia en la industria alimentaria, principalmente la láctea en la elaboración de productos fermentados (quesos, yogur) por su uso como cultivo iniciador, ya que confiere aroma y produce grandes cantidades de ácido láctico. Además que es capaz de producir una bacteriocina llamada nisina, aprobada por la FDA por su uso como antimicrobiano en la elaboración de productos alimenticios y por su potencial para inhibir microorganismos patógenos y alterantes de alimentos.

De manera general, la susceptibilidad mostrada por las BAL en función de la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ fue del 5% para los géneros *Leuconostoc* y *Lactococcus*, mientras que para las cepas que presentaron una CMI de 10 $\mu\text{g/mL}$, el 30% pertenecía al género *Lactobacillus*, el 25% a *Leuconostoc* y el 20% a *Lactococcus*. En lo que respecta a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ el 10% fue para *Lactobacillus* y el 5% para *Leuconostoc*.

Cabe resaltar la susceptibilidad a 1 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina presentada por las cepas *Leuc. Mesenteroides* subesp. *Mesenteroides* 1801 y *Lc. lactis* 0605, las cuales serían de utilidad para la detección de niveles arriba de los permitidos por la FDA en leche de vaca. Aún cuando la concentración permitida y la concentración a la cual fueron susceptibles estas BAL difiere ampliamente, la formación de un halo de inhibición indicaría la presencia de este antibiótico.

Estudios llevados a cabo por Danielsen y Wind (2003), Coppola y col. (2005) con respecto a los inhibidores de la síntesis de pared celular, señalan que los lactobacilos son frecuentemente sensibles a ampicilina y penicilina.

En nuestro estudio, el 37.50% de los lactobacilos fue susceptible a una CMI de 10 $\mu\text{g/mL}$ de penicilina, mientras que el resto lo fue a partir de la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Las cepas que presentaron una CMI de 10 $\mu\text{g/mL}$ para penicilina fueron *Lb. plantarum* (0508 y 1803) y *Lb. pentosus* 0506 (Fig. 10), estos resultados concuerdan con estudios realizados por Zarazaga y col. (1999), Herreros y col. (2005) en los que reportan

una CMI de 10 µg/mL de penicilina para lactobacilos. Por otro lado Swenson y col. (1990) mencionan que la mayoría de los lactobacilos presentan una CMI de 2 µg/mL para penicilina, caso que en nuestro estudio y en el de los otros autores no se presentó.

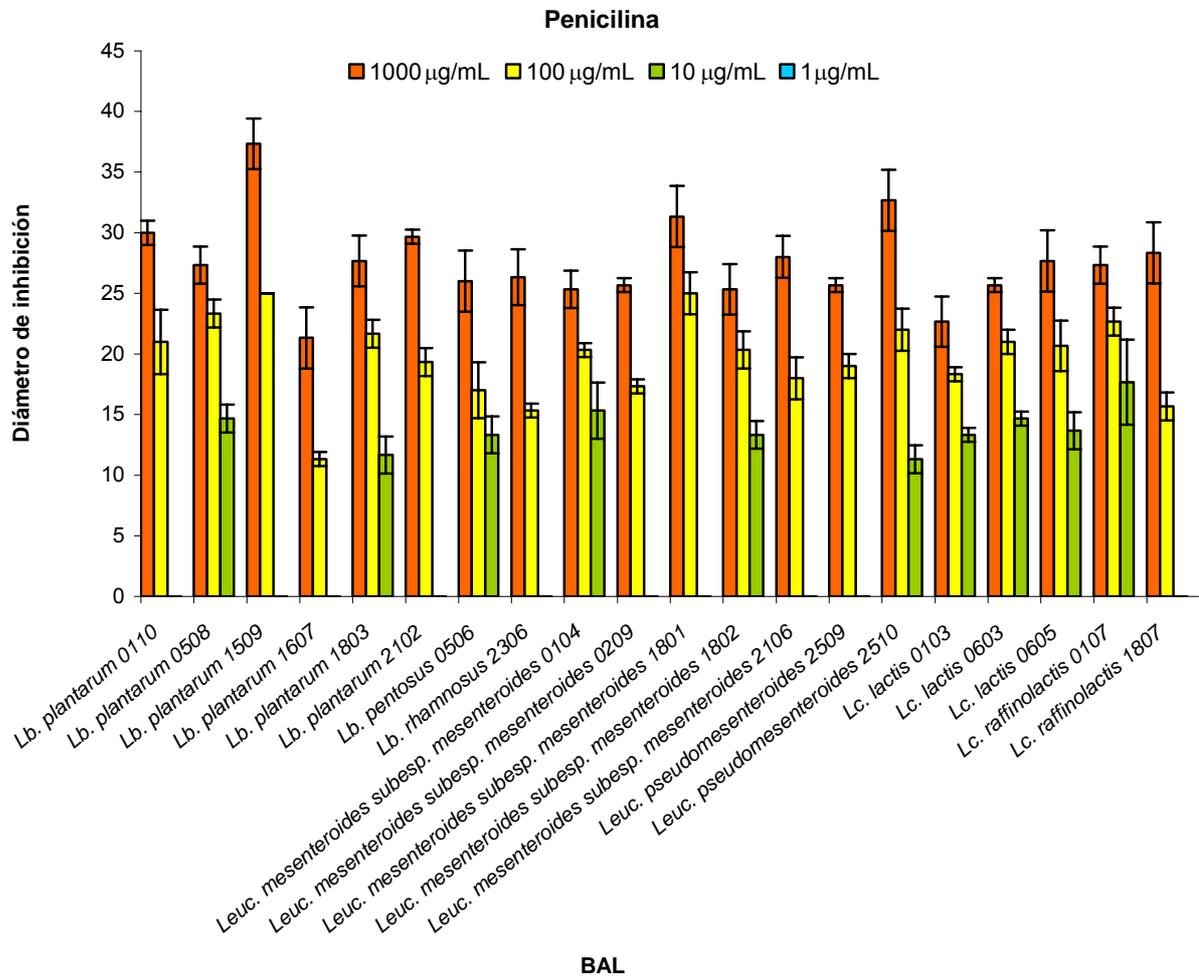


Figura 10. Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a penicilina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 µg/mL de penicilina y se incubaron a 30°C durante 24 h.

Las BAL del género *Leuc. mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* 0104 y 1802 presentaron una CMI de 10 µg/mL mostrando halos de inhibición de 15.33 ± 2.31 mm y 13.33 ± 1.15 mm respectivamente, en tanto que para las cepas 0209, 1801 y 2106 fue de 100 µg/mL, siendo la primera y la segunda la más susceptible y la más resistente, al ser inhibidas en un diámetro de 17.33 ± 0.58 mm y 25.00 ± 1.73 mm respectivamente.

Leuc. Pseudomesenteroides 2510 tuvo una CMI de 10 $\mu\text{g/mL}$ teniendo un valor de 11.33 ± 1.15 mm, el cual es muy cercano al de las cepas de *Leuc. Mesenteroides* inhibidas a esta concentración. En lo que respecta a la cepa *Leuc. Pseudomesenteroides* 2509 fue inhibida en un diámetro de 19.00 ± 1.00 mm por una CMI de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Las 3 cepas de *Lc. lactis* fueron inhibidas a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ así como *Lc. raffinolactis* 0107, siendo ésta cepa la más susceptible al presentar un halo de 16.67 ± 3.51 mm, sin embargo, comparándola con la cepa *Lc. lactis* 0103 (la más resistente) que fue inhibida en un diámetro de 13.33 ± 0.58 mm (Fig. 11), no existe una gran diferencia al restarles la desviación estándar, por el contrario, si la desviación fuera positiva incrementaría el valor promedio del halo, siendo mayor la diferencia entre ambas cepas. Por otro lado *Lc. raffinolactis* 1807 fue inhibida en un diámetro de 15.67 ± 1.15 mm con una CMI de 100 $\mu\text{g/mL}$.

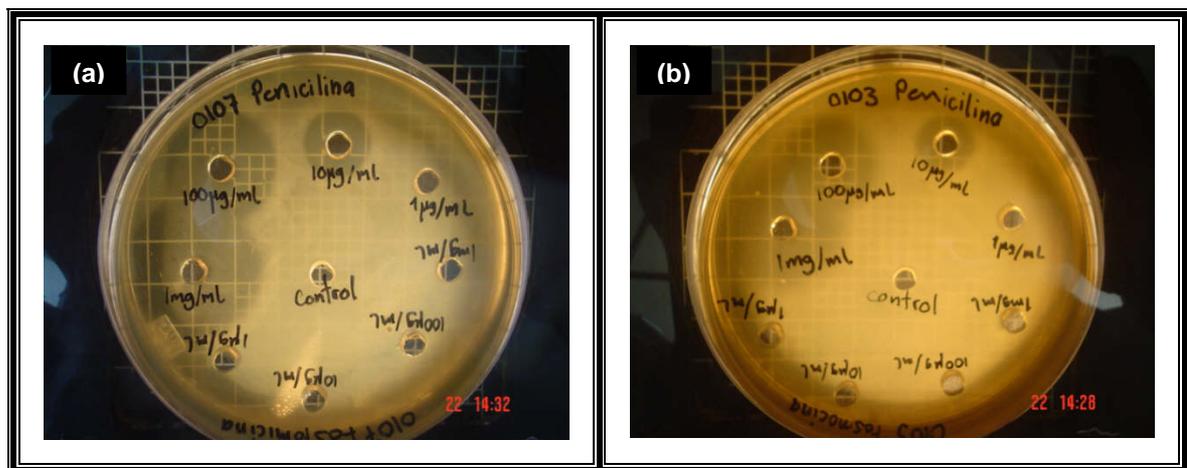


Figura 11. Cepa más susceptible (a) *Lc. raffinolactis* 0107 y cepa más resistente (b) *Lc. lactis* 0103 frente a penicilina con una CMI de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Tomando en cuenta la CMI de 10 $\mu\text{g/mL}$ que presentaron las BAL a penicilina, *Lactococcus* resultó ser el más susceptible a este antibiótico, ya que el 20% de las cepas inhibidas pertenecía a este género, mientras que *Leuconostoc* y *Lactobacillus* fueron inhibidas en un 15% cada una. Para las cepas que presentaron una CMI de 100 $\mu\text{g/mL}$, el 25% fue del género *Lactobacillus*, 20% *Leuconostoc* y 5% *Lactococcus*.

El espectro de la fosfomicina es amplio y abarca la mayoría de las bacterias Gram positivas, entre ellas las causantes de la mastitis como son *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, *S. aureus*), coliformes (*Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*), *Streptococcus* (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*) y actinomyces (*Corynebacterium spp.*) (Velasco y Yamasaki, 2002).

Dentro de las bacterias Gram positivas se encuentran las BAL, por lo que se decidió probar la susceptibilidad de estas ante la acción de fosfomicina, observando que la cepa *Lb. plantarum* 0110 fue la única bacteria de los 3 géneros y las 7 especies que mostró susceptibilidad a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ produciendo un halo de 20.33 ± 1.53 mm (Fig. 12), mientras que las restantes 19 cepas fueron resistentes a las 4 concentraciones del antibiótico. De los resultados anteriores se puede determinar que las BAL ensayadas no son de utilidad para la detección de este fármaco, ya que la concentración que provocó susceptibilidad es muy elevada.

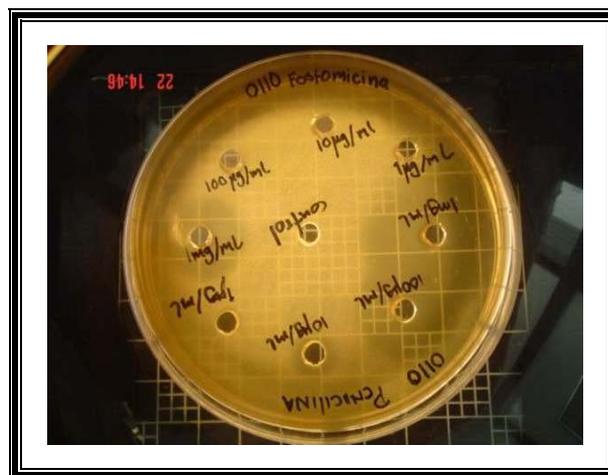


Figura 12. *Lb. plantarum* 0110, única cepa inhibida por fosfomicina con una CMI de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Knothe y col. (1991) realizaron un estudio *in vivo* con 8 voluntarios sanos, a los que les administraron 5 g de fosfomicina cada 12 h, detectando disminución de *E. coli* y *Enterococcus* en la flora intestinal, pero sin alteraciones en el recuento total de *Bacteroides* y bacterias lácticas anaerobias. Lo que nos hace suponer que las BAL en este caso, tampoco fueron susceptibles a la acción de fosfomicina.

La resistencia mostrada por las BAL a fosfomicina está en función a la impermeabilidad de su pared celular para este antibiótico, debido a la presencia de D-Ala-D-Lac que se encuentran en forma de dipéptido en la pared celular; esto asociado a que las BAL carecen de un transporte de electrones mediado por citocromos, el cual le es necesario para penetrar en el interior de la célula bacteriana (Condon, 1983; Klein y col., 2000).

El ADN es un ácido nucleico que se encuentra principalmente en los cromosomas que contienen la información hereditaria de los organismos. La molécula está constituida por dos cadenas helicoidales polinucleótidas, enroscadas entre sí en forma de doble hélice. Las dos cadenas se encuentran unidas por enlaces entre las bases: adenina, guanina, citosina o timina (Madigan y col., 2004).

El metronidazol inhibe la síntesis de ADN, ocasionando pérdida de la estructura helicoidal, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular, siendo activado por un proceso de reducción en aquellas células que poseen un sistema enzimático adecuado (Samuelson, 1999).

Debido al uso del metronidazol como agente antiparasitario, antimicótico o antimicrobiano en ganado bovino, se probó la susceptibilidad de las cepas ante este fármaco, para el cual el 100% de las BAL no mostró susceptibilidad a las diferentes concentraciones de este inhibidor, por lo cual, al igual que fosfomicina, estas BAL no son de utilidad para la detección de residuos de metronidazol en leche. Esta resistencia es intrínseca y está dada ya que las BAL no poseen actividad hidrogenasa, la cual está implicada en el efecto intracelular del metronidazol y que es necesaria para la producción de sus metabolitos activos, es decir, tienen escaso poder reductor lo que explicaría la inactividad del fármaco frente a las mismas (Church y col., 1996; Land y Johnson, 1999; Upcroft y Upcroft, 2001; Ammor y col., 2007).

En estudios realizados por Flórez y col. (2005) a cepas pertenecientes a las especies *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Leuc. pseudomesenteroides* y *Leuc. mesenteroides*, reportaron susceptibilidad a concentraciones ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ para metronidazol. Estos mismos resultados fueron obtenidos por Danielsen y Wind (2003) y Delgado y col. (2005).

La síntesis de las proteínas comienza con la unión entre sí de dos aminoácidos y continúa por el agregado de nuevos aminoácidos de a uno por vez en uno de los extremos de la cadena. El ARNm es el que lleva la información para la síntesis, es decir, determina el orden en que se unirán los aminoácidos. La síntesis de proteínas o traducción tiene lugar en los ribosomas del citoplasma celular. Una vez finalizada la síntesis de una proteína, el ARNm queda libre y puede ser leído de nuevo. De hecho, es muy frecuente que antes de que finalice una proteína ya está comenzando otra, con lo cual, una misma molécula de ARNm, está siendo utilizada por varios ribosomas simultáneamente. Esta etapa durante el desarrollo celular puede ser interrumpida por un grupo de antibióticos que según su mecanismo de acción inhiben la síntesis de proteínas como lo es cicloheximida para la cual, todas las BAL estudiadas no mostraron susceptibilidad a este inhibidor en las 4 concentraciones evaluadas. La incapacidad de generar algún efecto sobre las BAL se debe a que actúa interfiriendo la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional, en otras palabras, inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas, por lo que no afecta el metabolismo de organismos procariontes (Ennis y Lubin, 1964).

Otro antibiótico inhibidor de la síntesis de proteínas es clindamicina; con una CMI de 100 µg/mL fue susceptible el 65% de las cepas distribuyéndose por género de la siguiente manera: *Lactobacillus* y *Leuconostoc* con un 25% cada uno y 15% para *Lactococcus*. Para la CMI de 1000 µg/mL el 30% de las cepas se vio inhibido, siendo del 10% para cada género, mientras que el restante 5% estuvo integrado sólo por *Lb. plantarum* 0110 quien no se vio afectada por ninguna de las 4 concentraciones.

De los lactobacilos ensayados contra clindamicina, *Lb. plantarum* 0508 y 1607 fueron susceptibles únicamente a la concentración de 1000 µg/mL mostrando halos de 12.00 ± 1.00 mm y 9.67 ± 0.58 mm respectivamente. Por otro lado, las cepas de *Lb. plantarum* (1509, 1803 y 2102), *Lb. pentosus* 0506 y *Lb. rhamnosus* 2306 presentaron una CMI de 100 µg/mL, siendo la cepa 2306 la más susceptible (7.33 ± 0.58 mm) y la cepa 2102 la más resistente (13.00 ± 2.00 mm).

Estudios realizados por Charteris y col. (1998), Coppola y col. (2005) y Zhou y col. (2005) han encontrado que *Lactobacillus* es generalmente susceptible a antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas tal como clindamicina.

La utilización de *Lb. plantarum* 0110 como cultivo iniciador en la industria láctea sería relevante, ya que esta cepa en estudios anteriores realizados por Neria (2006) fue una de las cepas que presentó un amplio espectro de inhibición para bacterias Gram negativas como *Vibrio fluvialis*, *V. parahemolyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* ATCC 6539, *Shigella flexneri* ATCC 9199 y *Enterobacter aerogenes*. Así también hacia *Bacillus subtilis*.

De las 5 cepas de *Leuc. Mesenteroides* subesp. *mesenteroides*, la 0209 tuvo una CMI de 1000 µg/mL de clindamicina, mostrando un halo de inhibición de 15.67 ± 2.08 mm, en tanto que para las restantes cepas fue de 100 µg/mL, siendo la cepa 1801 la más susceptible de las BAL con un halo de 17.33 ± 1.15 mm (Fig. 13). En cuanto a *Leuc. Pseudomesenteroides* presentaron una CMI de 100 y 1000 µg/mL con un halo de 10.00 ± 3.00 mm y 11.67 ± 0.58 mm para las cepas 2510 y 2509 respectivamente.

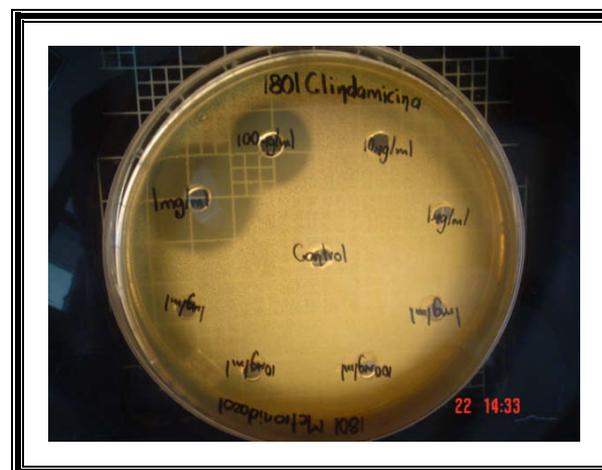


Figura 13. *Leuc. Mesenteroides* subesp. *Mesenteroides* 1801 cepa que presentó mayor susceptibilidad a clindamicina.

La poca susceptibilidad mostrada por *Leuc. Mesenteroides* subesp. *Mesenteroides* 2106 y 0209 al presentar una CMI de 100 y 1000 µg/mL respectivamente, pueden ser

útiles como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos, y no para detección de residuos de antibióticos en leche, ya que estas cepas en estudios realizados por Ramírez (2005) y Neria (2006) presentaron actividad inhibitoria frente *Listeria monocytogenes* Scott A y *L. monocytogenes* LCDC 81-860. Las especies de *Listeria* estan asociadas con alimentos tales como leche cruda, leche líquida supuestamente (o erróneamente) pasteurizada, quesos cuyas variedades han sufrido un corto periodo de maduración y en helados.

Las cepas de *Lc. raffinolactis* 0107 y 1807 presentaron una CMI de 100 y 1000 µg/mL, mientras que *Lc. lactis* también fue susceptible a estas concentraciones, siendo las cepas 0103 y 0603 susceptibles a 100 µg/mL y la 0605 a 1000 µg/mL (Fig. 14). Las cepas 0107 y 0603 diferentes en especie, presentaron el mismo tamaño de halo (7.00 ± 0.00 mm), en tanto la cepa 0103 mostró un valor cercano a ellas (8.00 ± 1.73 mm). Las cepas 0605 y 1807 mostraron diámetros de 14.67 ± 2.08 mm y 13.00 ± 1.73 mm respectivamente. De lo anterior se puede observar que este género no muestra gran variación en la susceptibilidad para este antibiótico.

Herreros y col. (2005) determinaron la resistencia de 9 cepas de *Lc. lactis* a 2 µg de clindamicina, siendo 5 cepas resistentes; para *Leuc. Mesenteroides* una de 2 cepas fue resistente, lo mismo ocurrió para *Lb. plantarum*. La susceptibilidad a clindamicina por estas cepas comparada con las ensayadas por nosotros se puede deber a que este antibiótico facilitó la fagocitosis y muerte intracelular de las bacterias, ya que esta puede ocurrir incluso a concentraciones subinhibitorias. Dado que la CMI para la mayoría de las bacterias anaerobias susceptibles es de 0.1-4 µg/mL (Lell y Kremsner, 2002), podemos decir que nuestras cepas, para este antibiótico no fueron susceptibles, sino más bien resistentes.

En la actualidad no se conocen informes sobre intoxicaciones provocadas por antibióticos de uso común ingeridos a través de la leche y se explica porque sus concentraciones resultan ser muy bajas como para provocar un efecto tóxico, con la excepción, posiblemente, del cloranfenicol que es capaz de causar un efecto adverso que se ejerce sobre la médula ósea, constituyéndose este antibiótico en una de las

drogas que comúnmente provoca anemia aplásica (Magariños, 2000).

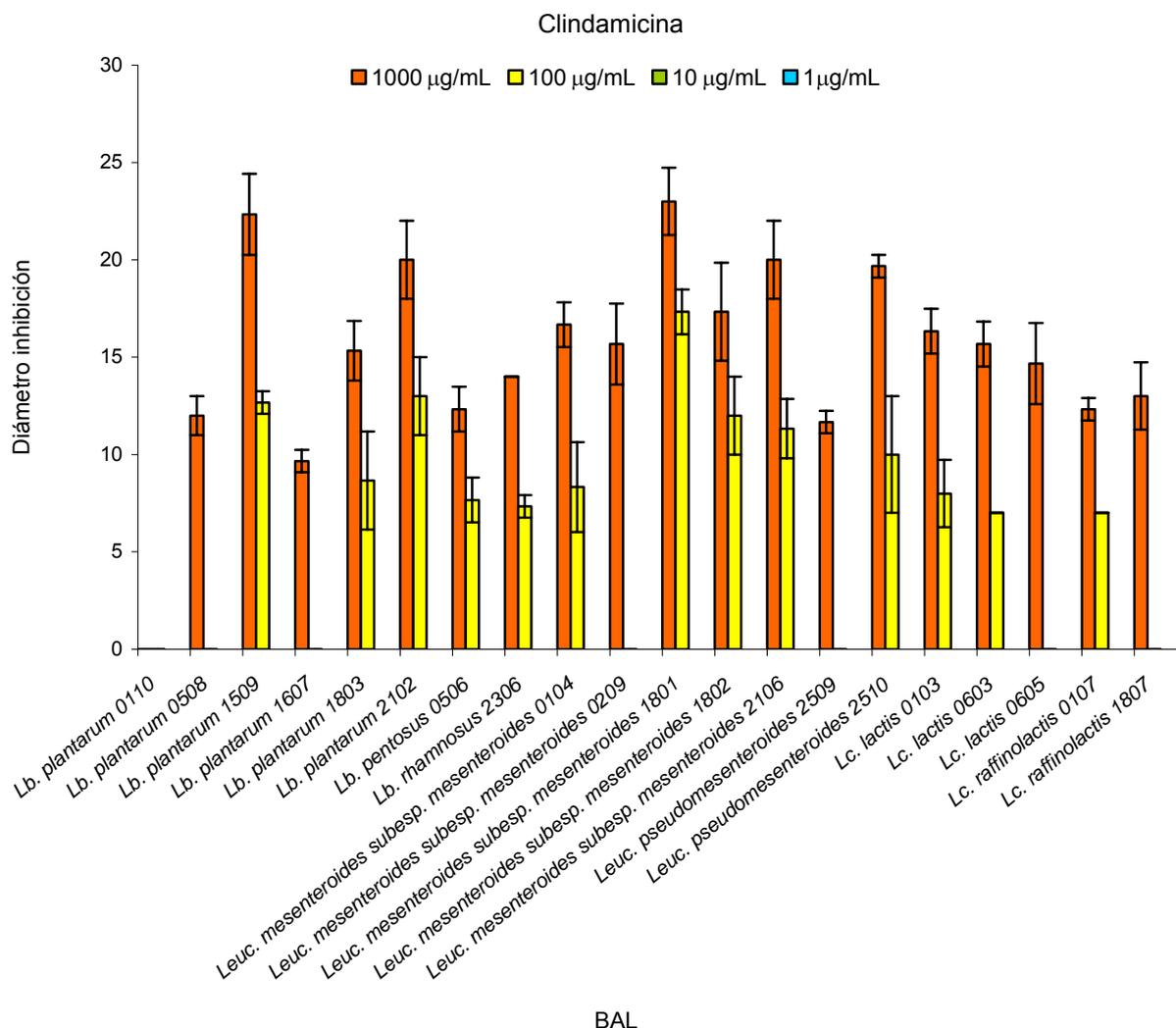


Figura 14. Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a clindamicina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 µg/mL de clindamicina y se incubaron a 30°C durante 24 h.

El hecho de que la frecuencia de aparición de los síntomas no tenga relación con la dosis y que la enfermedad se manifiesta especialmente en individuos que se han expuesto al fármaco en más de una ocasión, ha motivado a los Estados Unidos, Canadá y a los países de la Comunidad Europea, a prohibir o restringir su empleo en animales de abasto, existiendo multas a nivel de los productores y plantas procesadoras si se encuentran trazas de esta droga en los productos finales (Kucers, 1980; Settepani, 1984; Keukens y col., 1992; FDA, 2005).

El cloranfenicol es un antibiótico inhibidor de la síntesis de proteínas, en la figura 15 se observa como el 100% de las BAL mostró una CMI de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El 40% pertenecía al género *Lactobacillus*, encontrándose en éste *Lb. plantarum* 0508 la cepa más susceptible (14.67 ± 2.52 mm) y *Lb. plantarum* 1509 la más resistente (8.33 ± 1.53 mm) (Fig. 16). Para los otros dos géneros la inhibición se dio en un orden del 35 y 25% para *Leuconostoc* y *Lactococcus* respectivamente.

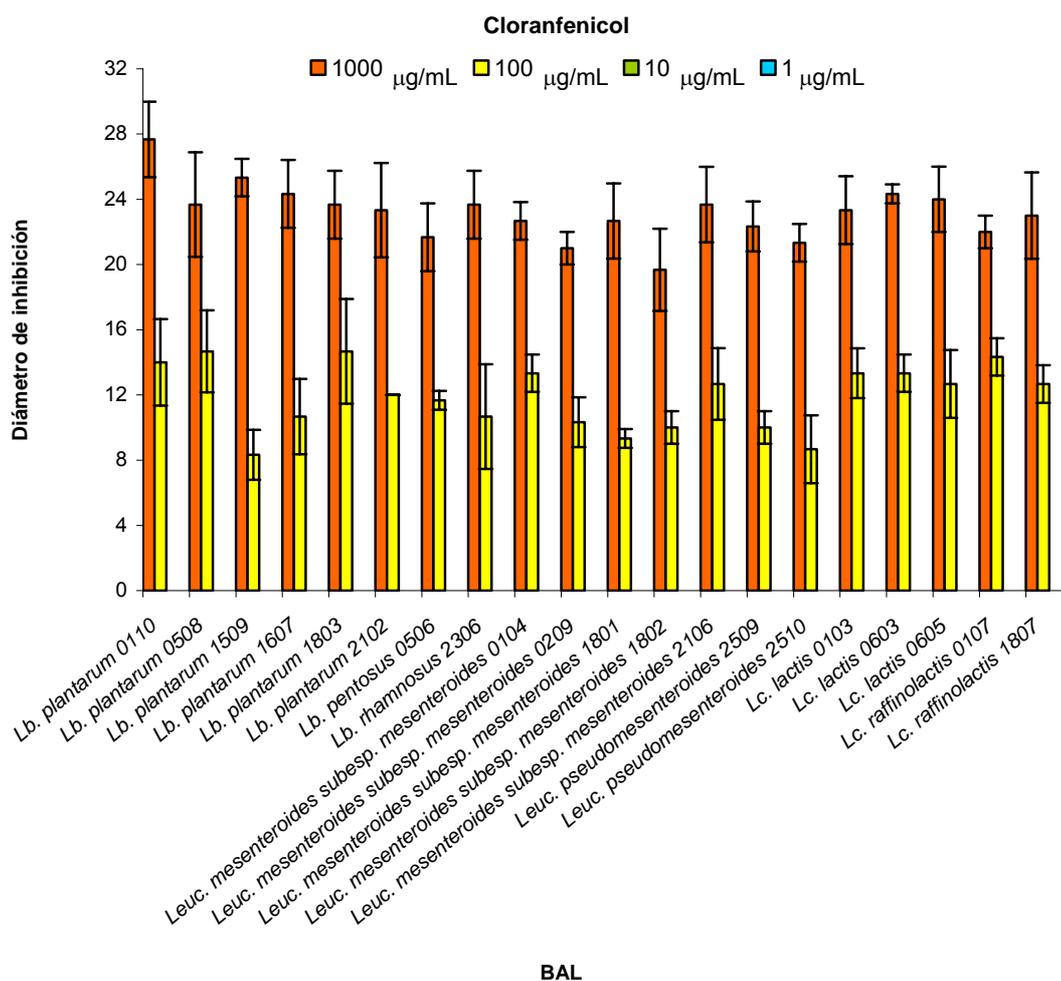


Figura 15. Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a cloranfenicol. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol y se incubaron a 30°C durante 24 h.



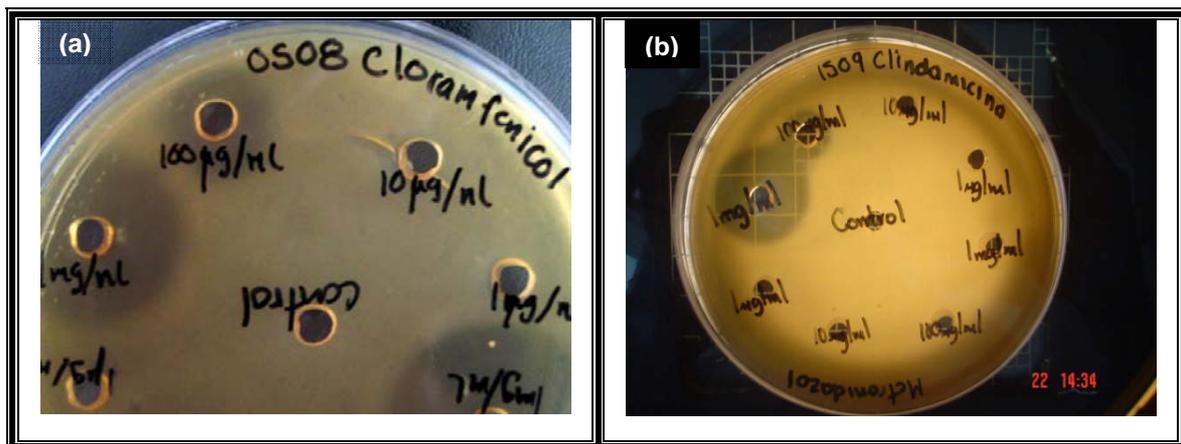


Figura 16. Cepa con mayor susceptibilidad (a) *Lb. plantarum* 0508 y cepa más resistente (b) *Lb. plantarum* 1509 a la acción de cloranfenicol con una CMI de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Estudios realizados por Herreros y col. (2005) a *Lc. lactis* subesp. *lactis*, *Lc. lactis* subesp. *Cremoris*, *Lc. lactis* subesp. *Lactis* var. *Diacetylactis*, *Leuc. Mesenteroides* subesp. *Mesenteroides*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* y *Lb. casei* subesp. *Casei*, aisladas de queso Armada; resultando resistentes a 30 μg de cloranfenicol 6 cepas de *Lc. lactis* de 9 ensayadas, 2 *Leuc. Mesenteroides* de 2, 1 *Lb. brevis* de 2 y 3 *Lb. casei* de 3. Esta concentración fue la única ensayada por los autores para este antibiótico, por lo cual no podemos saber a partir de que concentración son susceptibles o cuál sería su CMI para poder hacer una comparación con nuestros resultados, sin embargo, la concentración más cercana de las que ensayamos sería la de 10 $\mu\text{g/mL}$ a la cual todas nuestras cepas resultaron resistentes.

Por otro lado nuestros resultados y los de Herreros y col. (2005) difieren ampliamente con los reportados por Rojo-Bezares y col. (2006) al encontrar una CMI de 4 $\mu\text{g/mL}$ para 38 cepas de *Lb. plantarum*, 3 de *Leuc. Mesenteroides* y 1 *Lactobacillus* con una CMI de 2 $\mu\text{g/mL}$, todas ellas aisladas a partir de vino.

En la actualidad la eritromicina se encuentra aprobada por la FDA y la OMS, estableciendo un LMR de 0.05 $\mu\text{g/mL}$ y de 0.04 $\mu\text{g/mL}$ en leche. Al evaluar la susceptibilidad del género *Leuconostoc* ante este fármaco el cual inhibe la síntesis de

proteínas, se observó homogeneidad en la respuesta al antibiótico obteniéndose una CMI de 10 µg/mL, siendo las cepas *Leuc. Mesenteroides* subesp. *Mesenteroides* 0104 y 2106 la más resistente y susceptible respectivamente, al presentar halos de inhibición de 7.33 ± 0.58 mm y 11.33 ± 2.31 mm (Fig. 17).

Comparando los 3 géneros, *Leuconostoc* fue el más susceptible a eritromicina, ya que el total de sus cepas, quienes representan el 35% de las BAL fueron inhibidas a la concentración de 10 µg/mL, en tanto que los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus*, sólo representaron el 20 y 10% de las cepas inhibidas por esta concentración.

Cepas de *Leuconostoc* aisladas a partir de vino por Rojo-Bezares y col. (2006), presentaron una CMI de 0.5 µg/mL para este antibiótico.

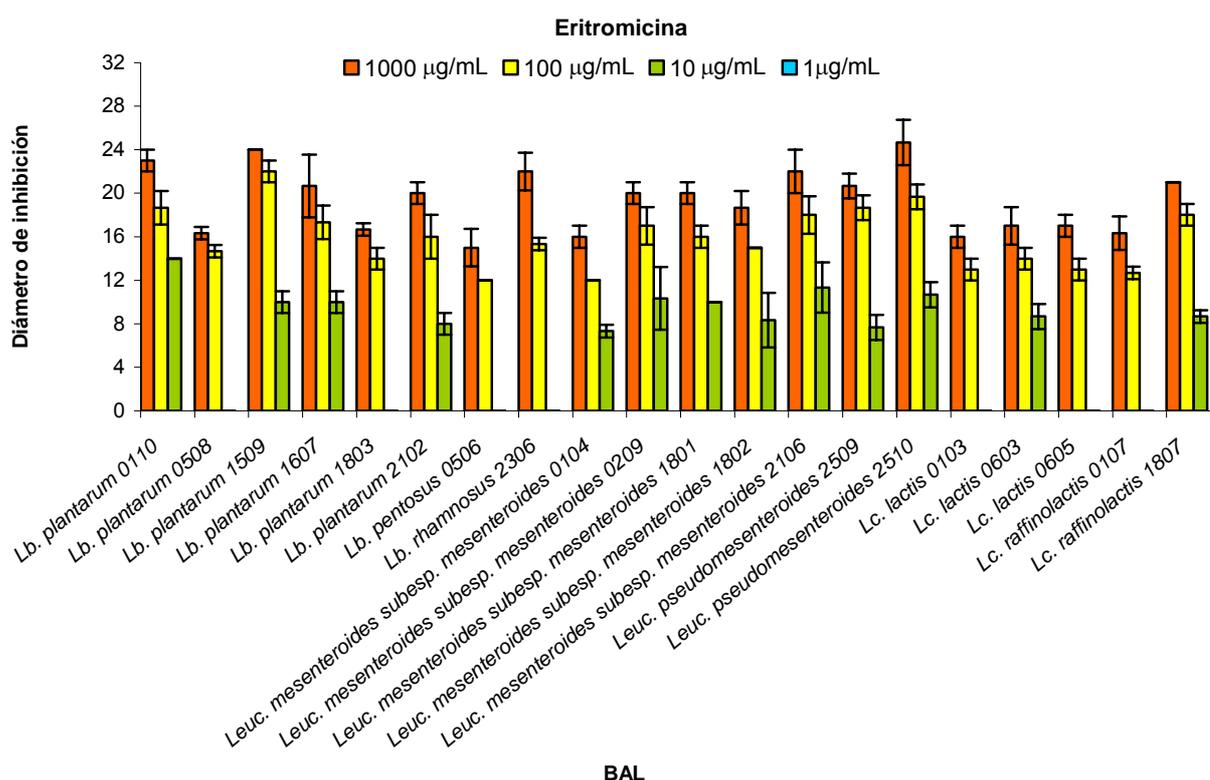


Figura 17. Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a eritromicina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 µg/mL de eritromicina y se incubaron a 30°C durante 24 h.

Las cepas *Lb. plantarum* 0110 (la más susceptible de las 20 BAL a eritromicina. Fig. 18), 1509, 1607 y 2102 presentaron una CMI de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para eritromicina, en tanto que las cepas *Lb. plantarum* 0508 y 1803 al igual que *Lb. pentosus* 0506 y *Lb. rhamnosus* 2306 tuvieron una CMI de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

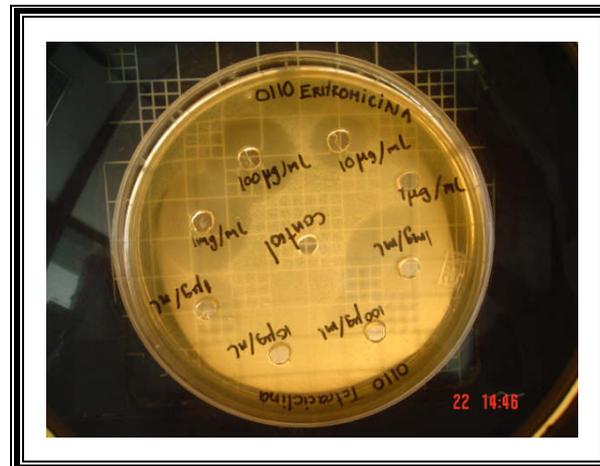


Figura 18. *Lb. plantarum* 0110 cepa que presentó mayor susceptibilidad del total de las BAL a eritromicina con una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Del grupo de los lactobacilos las cepas 1509 y 1607 presentaron halos de 10.00 ± 1.00 mm, encontrándose en un valor intermedio, ya que la cepa con mayor resistencia (2102) fue inhibida en un diámetro de 8.00 ± 1.00 mm y la cepa con mayor susceptibilidad (0110) fue de 14.00 ± 0.00 mm. Diámetros muy cercanos fueron provocados por la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en las BAL 0506, 1803, 0508 y 2306, con los siguientes valores 12.00 ± 0.00 mm, 14.00 ± 1.00 mm, 14.67 ± 0.58 mm y 15.33 ± 0.58 mm respectivamente.

En el trabajo realizado por Flórez y col. (2005) señalan haber aislado 23 cepas de *Lb. plantarum* - *Lb. paraplantarum* aisladas de queso azul, las cuales fueron ensayadas en un rango de dilución de 1-128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de eritromicina. Los resultados obtenidos por los autores muestran que 22 cepas presentaron una CMI de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que la restante fue de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado Rojo-Bezares y col. (2006) probaron la susceptibilidad de 38 cepas de *Lb. plantarum* teniendo un rango de 0.5-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la CMI. Estos resultados difieren ampliamente con los nuestros, sin embargo, Zhou y col. (2005) probaron la susceptibilidad de 2 nuevas cepas de *Lb. rhamnosus* de

actividad probiótica contra 18 antibióticos de uso común, comparándolas con 5 cepas comerciales de probióticos, en las cuales se encontraba una *Lb. rhamnosus* y una *Lb. plantarum*, reportando una susceptibilidad a 15 µg/mL de eritromicina para todas las cepas. Ésta concentración se encuentra próxima a la de 10 µg/mL que ensayamos, la cual inhibió a 4 cepas de *Lb. plantarum*.

Del género *Lactococcus*, las cepas *Lc. lactis* 0103 y 0605 presentaron un halo de 13.00 ± 1.00 mm, *Lc. raffinolactis* 0107 de 12.67 ± 0.58 mm teniendo una CMI de 100 µg/mL de eritromicina, mientras que *Lc. lactis* 0603 y *Lc. raffinolactis* 1807 presentaron una CMI de 10 µg/mL con halos de 8.67 ± 1.15 mm y 8.67 ± 0.58 mm respectivamente. Estos resultados difieren con los obtenidos por Flórez y col. (2005) quienes reportan una CMI de 1 µg/mL de eritromicina para 69 de 71 cepas de *Lc. lactis*, así como con los de Hummel y col. (2007) en el que para 11 cepas determinaron una CMI de 1.5 µg/mL. La resistencia presentada por nuestras cepas puede deberse a una disminución del ingreso del antibiótico a la célula, ya que este es frecuentemente el principal mecanismo de resistencia (Escolar y col., 1998a).

La FDA y la OMS establecen un LMR de 0.125 y 0.2 µg/mL para estreptomina. El efecto bactericida que posee, sólo vio reflejado a altas concentraciones (Fig. 19), ya que el 65% de las BAL tuvo una CMI de 1000 µg/mL, el 25% de 100 µg/mL y el restante 10%, integrado por las cepas *Lb. plantarum* 2102 y *Lb. rhamnosus* 2306 no fue susceptible a ninguna de las concentraciones ensayadas.

Charteris y col. (1998) así como Coppola y col. (2005) han referido que los lactobacilos son resistentes a estreptomina, dicha afirmación la pudimos observar también en nuestro estudio, ya que *Lb. plantarum* 1803 fue la única cepa de *Lactobacillus* que presentó una CMI de 100 µg/mL con un halo de 7.67 ± 0.58 mm, mientras que el resto de los lactobacilos presentó susceptibilidad a 1000 µg/mL, siendo la cepa *Lb. plantarum* 0508 la más susceptible para esta concentración, al ser inhibida en un diámetro de 13.67 ± 1.53 mm y *Lb. plantarum* 1607 la de mayor resistencia al formar un halo de 8.00 ± 1.73 mm.

A la resistencia presentada a estreptomicina también han hecho mención Rojo-Bezares y col. (2006) al encontrar una CMI de 512 $\mu\text{g/mL}$ para 38 cepas de *Lb. plantarum*, valores similares fueron observados por Elkins y Mullis (2004) en el cual los lactobacilos muestran una resistencia intrínseca a los aminoglucósidos (estreptomicina), según ellos debida a la impermeabilidad de su membrana. Por otro lado Zhou y col. (2005) reportaron resistencia a 10 $\mu\text{g/mL}$, siendo la única concentración ensayada para cepas de *Lb. rhamnosus* y *Lb. plantarum*.

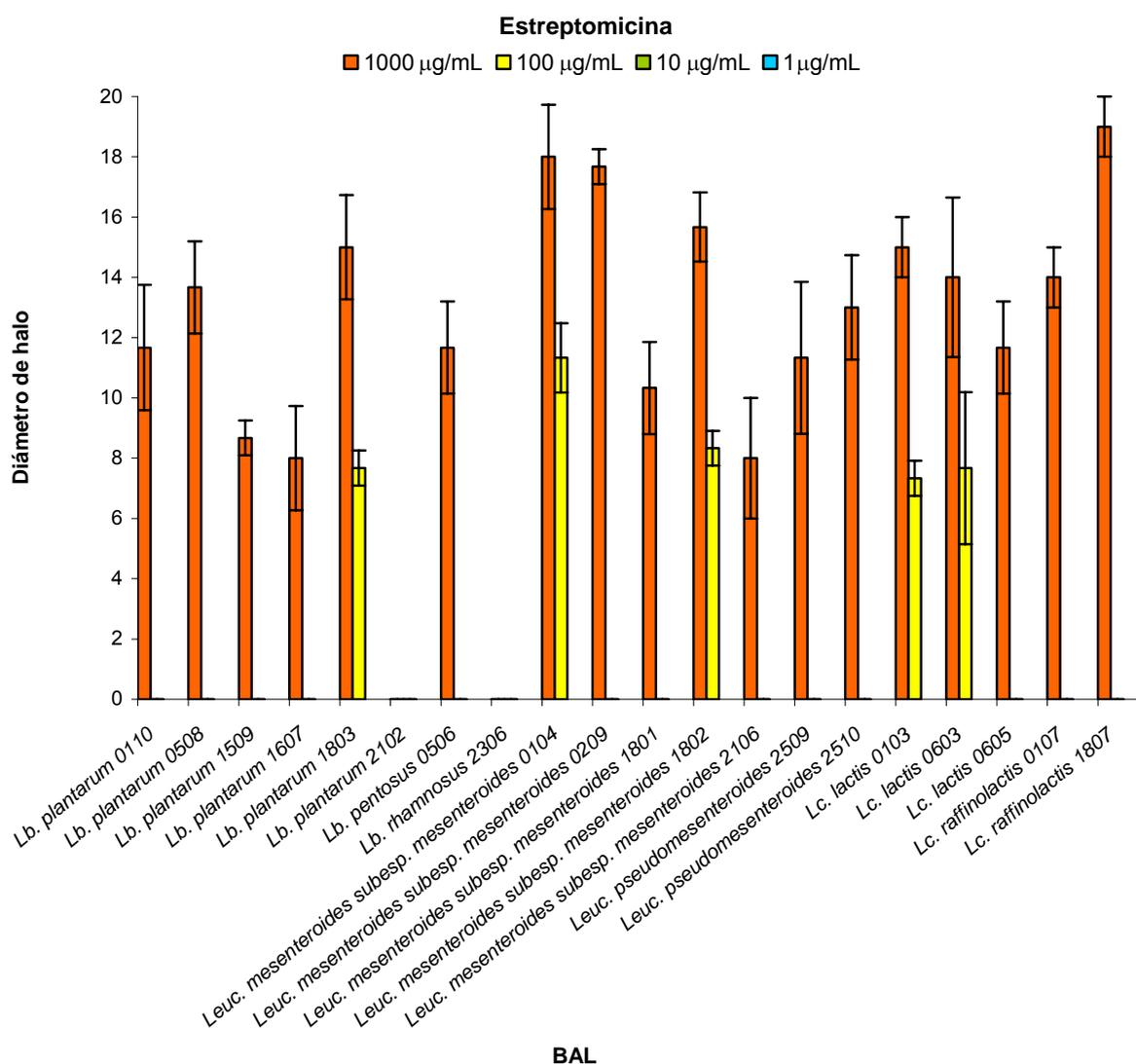


Figura 19. Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a estreptomicina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina y se incubaron a 30°C durante 24 h.

Swenson y col. (1990), Herrero y col. (1996), Zarazaga y col. (1999), Katla y col. (2001) y Flórez y col. (2005) han destacado que las diferentes especies de *Leuconostoc* son usualmente resistentes a estreptomycin. En nuestro estudio esta resistencia se pudo observar en *Leuc. Mesenteroides* subesp. *Mesenteroides* 0104 y 1802 quienes presentaron una CMI de 100 µg/mL, resultando halos de inhibición de 11.33 ± 1.15 mm y 8.33 ± 0.58 mm. Para el resto del género, se observó inhibición a la concentración de 1000 µg/mL, siendo la cepa 0209 la más susceptible (17.67 ± 0.58 mm) y 2106 la más resistente (8.00 ± 2.00 mm). Por otro lado Rojo-Bezales y col. (2006) reportaron una CMI de 64 µg/mL para *Leuc. Mesenteroides*, esta resistencia de las BAL se puede deber también al bajo pH del medio que las rodea, disminuyendo así el ingreso de la estreptomycin al citoplasma bacteriano (Delgado, 1990).

La susceptibilidad mostrada por *Lc. raffinolactis* estuvo en función de la concentración más alta para ambas cepas (0107 y 1807) con halos de 14.00 ± 1.00 mm y 19.00 ± 1.00 mm, a ésta misma concentración de 1000 µg/mL resultó inhibida *Lc. lactis* 0605 (11.67 ± 1.53 mm), siendo la más susceptible a esta concentración. Las cepas *Lc. lactis* 0103 y 0603 fueron inhibidas en un diámetro de 7.33 ± 0.58 mm y 7.67 ± 2.52 mm respectivamente con una CMI de 100 µg/mL.

La baja susceptibilidad de *Lactococcus* es de importancia tecnológica, puesto que son cepas utilizadas con mucha frecuencia en la elaboración de productos fermentados, por lo que diversos estudios han sido realizados con el fin de demostrar cómo la presencia de residuos de antimicrobianos en leche causan la inhibición de su crecimiento (Champagne, 1992; Scheiffmann y col., 1992; Oh y col., 1996).

Dentro del grupo de inhibidores de la síntesis de proteínas, estreptomycin es el antibiótico al cual las BAL han presentado menor susceptibilidad. La resistencia a estreptomycin está considerada intrínseca en las BAL (Katla y col., 2001; Danielsen y Wind, 2003), siendo atribuida a la ausencia de citocromos en la cadena transportadora de electrones (Charteris y col., 2001), a la estructura de la pared celular y a la impermeabilidad de la membrana, que juega un importante rol en esta resistencia

(Elkins y Mullis, 2004). Aunado a todo lo anterior los aminoglucósidos son mucho más activos en pH alcalino que en pH ácido (Brooks y col., 2005).

En general, el empleo de estas BAL en la detección de residuos de estreptomicina en leche, no sería muy factible debido a la resistencia que presentan. Sin embargo, la utilización de estas cepas como cultivo iniciador sería de gran utilidad, por el potencial inhibitorio que tienen contra microorganismos patógenos y deterioradores de alimentos.

Las tetraciclinas (clortetraciclina, tetraciclina, etc.) actúan a nivel del ribosoma bacteriano, pero para que las mismas tengan acceso a éste es necesaria su difusión pasiva por la membrana celular exterior, requiriendo de un segundo proceso dependiente de energía que transporta activamente todas las tetraciclinas a través de la membrana citoplasmática interna (Rodríguez y col., 1998).

La FDA y la OMS permiten la presencia de estos antibióticos en leche, con un LMR de 0.08 y 0.1 µg/mL respectivamente. Si este tipo de medicamentos aparece en la leche, es debido a que se administra a los animales como tratamiento para determinadas enfermedades infecciosas. El exceder este límite constituye un delito contra la salud, con las consecuencias que esto conlleva, como son sanciones administrativas o penales, según sea el tipo de infracción (sustancia, riesgo sanitario, reincidencia, etc.). Por lo cual se probó la susceptibilidad de las BAL a clortetraciclina, observando que las cepas de la especie *Lb. plantarum* 1509, 1607 y 2102 presentaron una CMI de 10 µg/mL; mientras *Lb. plantarum* 0110, 0508 y 1803, además de *Lb. pentosus* 0506 resultaron más susceptibles, al ser inhibidas por la concentración de 1 µg/mL (Fig. 20), esto nos indica la diferencia que puede existir entre los integrantes de un mismo grupo de BAL, ya que dentro de este género también hubo una CMI de 100 µg/mL para *Lb. rhamnosus* 2306.

De las cepas de lactobacilos ensayadas a la concentración de 1 µg/mL de clortetraciclina, *Lb. plantarum* 0110 fue la más resistente al ser inhibida en un diámetro de 10.33 ± 0.58 mm y *Lb. plantarum* 1803 la más susceptible con un diámetro de 12.00 ± 2.00 mm.

Esta diversidad en los valores de CMI también se observó para clortetraciclina en un estudio llevado a cabo por Dawson y col. (1984), ya que para el género *Lactobacillus* el 12.5% de las cepas tuvo una CMI $\leq 4 \mu\text{g/mL}$, el 31.2% estuvo en un rango de 8-64 $\mu\text{g/mL}$ y finalmente el 56.3% presentó una CMI $\geq 128 \mu\text{g/mL}$, sin dar una posible explicación de este comportamiento.

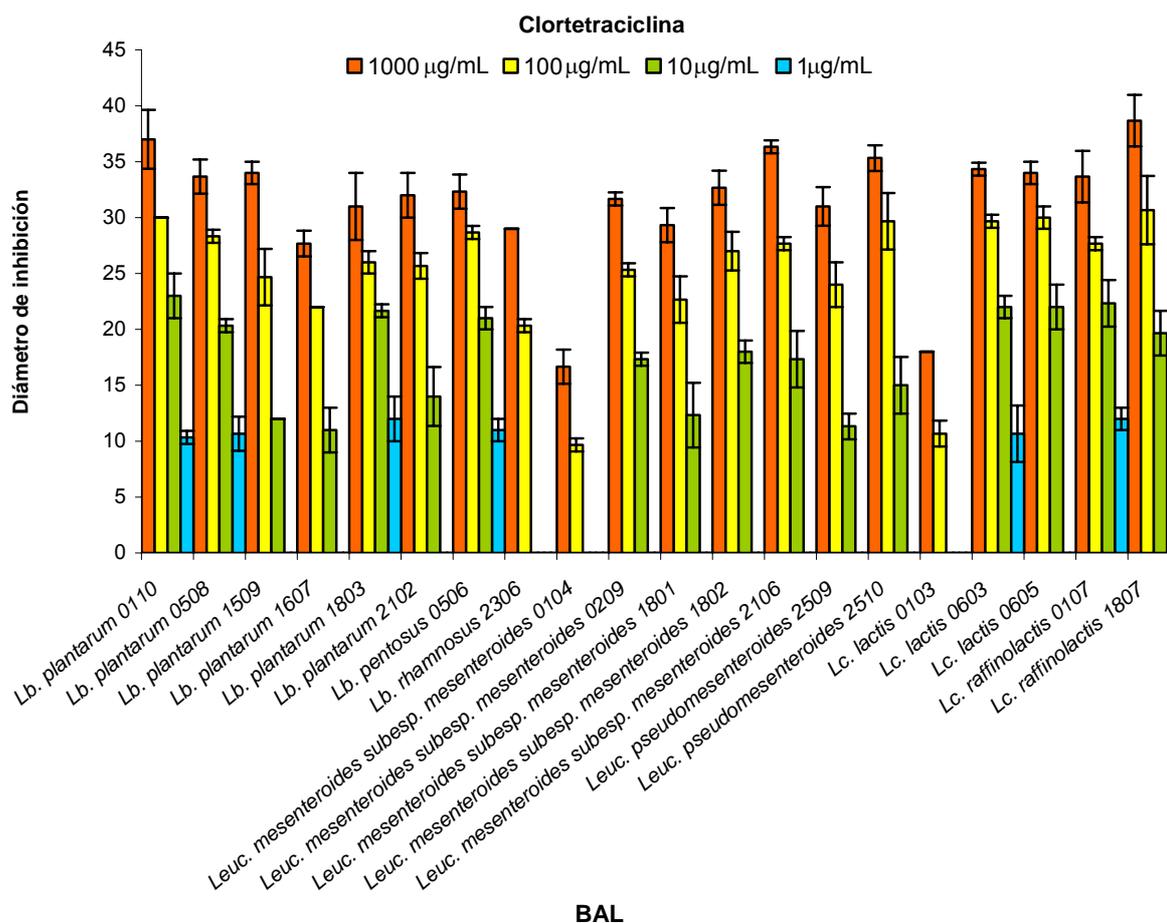


Figura 20. Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a clortetraciclina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 $\mu\text{g/mL}$ de clortetraciclina y se incubaron a 30°C durante 24 h.

El 30% de las cepas que presentó una CMI de 10 $\mu\text{g/mL}$ para clortetraciclina, pertenecía al género *Leuconostoc*, incluida la especie *Leuc. Pseudomesenteroides*. La cepa *Leuc. Mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* 1802 fue la de mayor susceptibilidad ($18.00 \pm 1.00 \text{ mm}$) y *Leuc. Pseudomesenteroides* 2509 la de menor ($11.33 \pm 1.15 \text{ mm}$).

La cepa *Leuc. Mesenteroides* subesp. *Mesenteroides* 0104 fue la única en presentar una CMI de 100 µg/mL, mostrando un halo de 9.67 ± 0.58 mm.

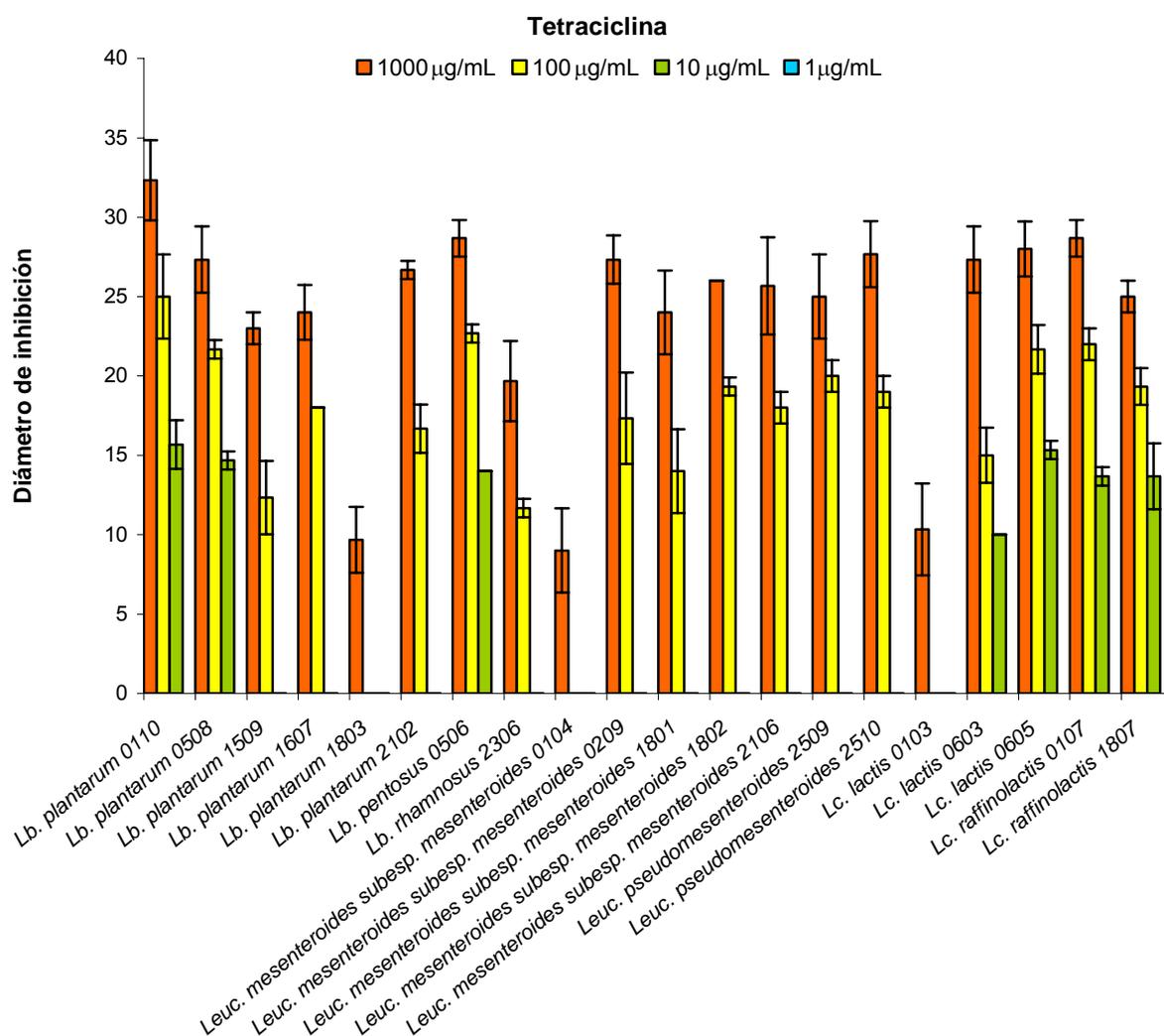
El grupo de los leuconostocs comparado con los lactobacilos presentó mayor homogeneidad en su CMI, sin embargo, el género *Lactococcus* integrado por la minoría de las cepas mostró concentraciones de inhibición de 1 µg/mL para las cepas *Lc. lactis* 0603 (10.67 ± 2.52 mm) y *Lc. raffinolactis* 0107 (12.00 ± 1.00 mm); de 10 µg/mL para *Lc. lactis* 0605 (22.00 ± 2.00 mm) y *Lc. raffinolactis* 1807 (19.67 ± 2.00 mm) y finalmente de 100 µg/mL para *Lc. lactis* 0103 (10.67 ± 1.15 mm).

La diferencia de las concentraciones inhibitorias que se presentaron para un mismo género puede estar dado por las diferentes etapas en las que actúa el grupo de las tetraciclinas, que dependiendo de la concentración van desde la formación de porinas hasta la inhibición de la síntesis de proteínas. Además de inhibir sistemas enzimáticos bacterianos como la fosforilación oxidativa, quelar cationes metálicos como hierro, calcio y magnesio, impidiendo que este último actúe en la unión de las 2 subunidades del ribosoma durante la síntesis proteica.

Continuando con los resultados para la familia de las tetraciclinas, se probó el antibiótico más representativo, “tetraciclina”, para el cual la FDA y la OMS establecen los mismos valores que para clortetraciclina como límite en leche.

Las cepas *Lb. plantarum* 0110 y 0508 así como *Lb. pentosus* 0506 presentaron una CMI de 10 µg/mL de tetraciclina, siendo la cepa 0110 la más susceptible (15.67 ± 1.53 mm), en tanto que para 100 µg/mL fueron las cepas *Lb. rhamnosus* 2306 y *Lb. plantarum* 1509, 2102 y 1607, siendo esta última la de mayor susceptibilidad (18.00 ± 0.00 mm). La cepa que presentó mayor resistencia de este grupo de BAL, al ser inhibida por la concentración de 1000 µg/mL fue *Lb. plantarum* 1803 con el menor diámetro de halo (9.67 ± 2.08 mm). En la figura 21 se observa una vez más la diferencia en los diámetros de los halos en este género para una misma concentración.

En el año 2005, Zhou y col. encontraron que cepas con potencial probiótico de *Lb. rhamnosus* y *Lb. plantarum* fueron susceptibles a 30 μg de este antibiótico. En el mismo año Herreros y col. reportaron susceptibilidad a 30 μg para cepas de *Lb. plantarum*, aisladas a partir de queso elaborado artesanalmente. Por el contrario, Flórez y col. (2005) encuentran cepas de *Lb. plantarum* resistentes a tetraciclina, al determinar una CMI de 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, todos los valores anteriores se encuentran dentro del rango de las concentraciones que utilizamos y que provocaron susceptibilidad a los lactobacilos.



BAL

Figura 21. Susceptibilidad de las cepas de BAL frente a tetraciclina. Las cepas se probaron en medio sólido a concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina y se incubaron a 30°C durante 24 h.

El género *Leuconostoc* se vio afectado principalmente por la concentración de 100 µg/mL, siendo la cepa *Leuc. Mesenteroides* subesp. *Mesenteroides* 1801 la menos susceptible al presentar un halo de 14.00 ± 2.65 mm, mientras que la de mayor susceptibilidad fue *Leuc. Pseudomesenteroides* 2509 con un halo de 20.00 ± 1.00 mm. Por otro lado, *Leuc. Mesenteroides* subesp. *Mesenteroides* 0104 fue la única cepa inhibida por la concentración de 1000 µg/mL siendo la más resistente de las 20 BAL ensayadas, al ser inhibida en un diámetro de 9.00 ± 2.65 mm. Esta característica ha sido destacada por Swenson y col. (1990) y Flórez y col. (2005), al mencionar que la mayoría de las especies de *Leuc. Mesenteroides* son resistentes a tetraciclina.

En el estudio antes mencionado llevado a cabo por Herreros y col. (2005) realizaron pruebas a cepas de *Leuc. Mesenteroides*, encontrando que este género fue resistente a 30 µg de tetraciclina, en nuestro trabajo todas las cepas de *Leuconostoc* presentaron resistencia a 10 µg/mL, la cual fue la concentración más cercana a la probada por ellos.

En nuestro estudio, *Lc. lactis* 0603 y 0605 así como *Lc. raffinolactis* 0107 y 1807 fueron susceptibles a 10 µg/mL de tetraciclina, siendo la cepa *Lc. lactis* 0603 la más resistente a esta concentración dado que mostró un halo de 10.00 ± 0.00 mm; *Lc. lactis* 0605 la cepa de mayor susceptibilidad con un halo de 15.33 ± 0.58 mm, mientras que la única cepa con una CMI de 1000 µg/mL fue *Lc. lactis* 0103 quien presentó un halo de 10.33 ± 2.89 mm. Nuestros resultados, en los que el 80% de los lactococos se vieron inhibidos por la concentración de 10 µg/mL, se asemejan a los de Herreros y col. (2005) quienes ensayaron cepas de *Lc. lactis* a la concentración de 30 µg para el mismo antibiótico, encontrando que el 66.66% de las cepas fue susceptible.

7. CONCLUSIONES

Las 20 cepas de BAL estuvieron libres de contaminación.

Todas las BAL fueron resistentes al único inhibidor de la síntesis de ADN ensayado (metronidazol).

Las BAL, ante los inhibidores de la síntesis de pared celular presentaron mayor susceptibilidad a ampicilina, seguida por amoxicilina, penicilina y fosfomicina. Siendo el género *Leuconostoc* el más susceptible a ampicilina y *Lactobacillus* el de menor susceptibilidad.

Lb. plantarum 0110 fue la única cepa inhibida por fosfomicina a una concentración de 1000 µg/mL.

De los inhibidores de la síntesis de proteínas, clortetraciclina fue la que provocó mayor susceptibilidad a las BAL, seguido por eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, clindamicina, estreptomycinina y cicloheximida, siendo *Lactobacillus* y *Leuconostoc* los géneros más y menos susceptibles respectivamente.

Todas las cepas fueron resistentes a las cuatro concentraciones de cicloheximida.

Las cepas de mayor susceptibilidad al ser inhibidas por la concentración de 1µg/mL fueron: *Leuc. Mesenteroides* subesp. *Mesenteroides* 1801, *Lc. lactis* 0605, *Lb. plantarum* 0508, *Lb. plantarum* 1803, *Lb. pentosus* 0506, *Lc. lactis* 0603 y *Lc. raffinolactis* 0107; siendo las dos primeras para ampicilina y las restantes para clortetraciclina.

Las BAL evaluadas que resultaron susceptibles, son de utilidad en la detección de residuos de antibióticos a las concentraciones ensayadas. Además de que las cepas podrían ser empleadas como cultivos iniciadores.

9. PERSPECTIVAS

El hallazgo de la susceptibilidad y resistencia de las BAL a los antibióticos utilizados en los ensayos, nos da la pauta para contar con el posible uso de estos microorganismos como cultivos iniciadores en la industria alimenticia, principalmente la láctea. Sin embargo, para que esto sea posible, deben analizarse además de estos datos otras pruebas para obtener la caracterización completa de las cepas, así como su compatibilidad entre las diferentes especies.

9. BIBLIOGRAFÍA

Accolas, J. P., Hemme, D., Desmazeaud, M. J., Vassal, L., Bouillanne, C., Veaux, M. (1980). Les levains lactiques thermophiles: propriétés et comportement en technologie laitière. Une revue. *Lait*. 60:487-524.

Albu, R. E. (1998). Amoxicillin: a pharmacologic description. *Clin Excell Nurse Pract*. 5:260-262.

Alvarado, R. C. C. (2000). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias lácticas de un queso ahumado andino artesanal. Posterior uso como cultivo iniciador. Tesis de licenciatura, Universidad de Los Andes Mérida, Venezuela.

Alvarez-Elcoro, S., Enzler, M. J. (1999). The macrolides: erythromycin, clatithromycin, and azitromycin. *Mayo Clin. Proc*. 74:613-634.

Amador, L. R., Rendón, E. E., Montaña, R. R. (1993). Manual de laboratorio de microbiología sanitaria. 2ª ed. I.P.N. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Depto. de Microbiología.

Ammor, S. M., Flórez, B. A., Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non Enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*. 24:559-570.

Amozou, K. S., Prevost, H., Divies, C. (1985). Effect of magnesium supplementation of milk on lactic fermentation by *Streptococcus lactics* and *Streptococcus thermophilus*. *Le Lait*. 65:21-34.

Andersson, E. M., Daeschel, A., Hassan, H. M. (1988). Antibacterial activity of plantaricin SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Biochimie*. 70:381-390.

Archibald, F. S. (1986). Manganese: its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. *CRC Crit. Rev. Microbiol*. 13:63-109.

Axelsson, L. T. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd rev. and exp. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.1-66.

Azemun, P., Stull, T., Roberts, M., Smith, A. L. (1981). Rapid detection of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 20:168.

Baird-Parker, A. C. (1980). Organic acids. En: *Microbial ecology of foods*. Silliker, J. H., Elliot, R. P., Baird-Parker, A. C., Bryan, F. L., Christian, J. H. B., Clark, D. S., Olson, Jr., Roberts, T. R. (Eds). Ed. New York, Academic Press. pp. 126-135.

Barakat, R. K., Griffiths, M. W., Harris, L. J. (2000). Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus* and *Enterococcus* sp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *Int. J. Food Microbiol*. 62:83-94.

- Barthélémy, P., Autissier, D., Gerbaud, G., Courvalin, P. (1984). Enzymatic hydrolysis of erythromycin by a strain of *Escherichia coli*. *J. Antibiotic Tokyo*. 37:1692-1696.
- Bartlett, J. G. (1990). *Clostridium difficile*: clinical considerations. *Rev. Infect. Dis.* 12:S244.
- Bear, D. M., Turck, M., Petersdorf, R. G. (1970). Ampicillin. *Med. Clin. North Am.* 54(51):145-159.
- Begg, E. J., Barcgat, M. L. (1995). Aminoglycosides. 50 years on. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 39(6):597-603.
- Belal, F., El-Kerdawy, M. M., El-Ashry, S. M., El-Wasseef, D. R. (2000). Kinetic spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms. *Farmaco* 55:680-686.
- Blom, H., Mortvedt, C. (1991). Anti-microbial substances produced by food-associated microorganisms. *Biochem. Soc. Trans.* 19:694-698.
- Booth, J. M., Harding, F. (1986). Testing for antibiotic residues in milk. *Vet. Rec.* 119:565-569.
- Boyaval, P. (1989). Lactic acid bacteria and metal ions. *Le Lait*. 69:87-113.
- Brooks, G. F., Butel, J. S., Morse, S. A. (2005). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Ed. El manual moderno. México, D. F. pp. 181-186.
- Brulé, G., Fauquant, J. (1982). Interactions des protéines du lait et des oligoelements. *62:323-331*.
- Bruno, M. E., Montville, T. J. (1993). Common mechanism action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(9):3003-3010.
- Caplice, E., Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50:131-149.
- Carr, F. J., Chill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28:281-370.
- Casp, V. A., Requena, J. A. (1999). *Procesos de conservación de alimentos*. Colección de Tecnología de Alimentos. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. pp. 97-98.
- Castro, B. L. A., Restrepo, D. C. (2006). Probióticos: utilidad clínica. *Colomb. Med.* 37(4):308-314.
- Cerna, E., Piemanova, B. Janicek, J. (1982). Residuos de sustancias extrañas en la leche. En: *Fabricación de productos lácteos*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 55-83.

- Champagne, C. P. (1992). Effect of penicillin on free or immobilized lactococci: milk acidification and residual antibiotic level. *J. Food Saf.* 12(4):327-337.
- Charteris, W. P., Kelley, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. (1998). Antibiotics susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* 61:1636-1643.
- Charteris, W. P., Kelley, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. (2001). Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. *J. Food Prot.* 64:2007-2014.
- Chopra, I., Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:232-260.
- Church, D. L., Bryant, R. D., Sim, V., Laishley, E. J. (1996). Metronidazole susceptibility and the presence of hydrogenase in pathogenic bacteria. *Anaerobe. Academic Press* 2(3):147-153.
- Clavel, M. M. (2006). Condiciones microbiológicas y aislamiento de bacterias lácticas en quesos artesanales del Estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Cloutier, M. J. (1995). Antibiotics: Mechanisms of action and the acquisition of resistance--when magic bullets lose their magic. *Am. J. Pharmaceutical Education.* 59:167-172.
- Cogan, T. M., Hill, C. (1993). Cheese starter cultures. En: *Cheese: chemistry, physics and microbiology.* Fox, P. F. (Ed). Ed. Chapman and Hall, London. pp. 193-255.
- Cogan, T. M., Accolas, J. P. (1996). Dairy starter cultures. Wiley-VCH. U.S.A. pp. 1-20.
- Condon, S. (1983). Aerobic metabolism of lactic acid bacteria. *Ir. J. Food. Sci. Technol.* 7:15-25.
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:269-280.
- Contardo, V. M., Bustamante, G., Rodríguez, J. (2005) Probióticos en niños con diarrea aguda. *Rev. Ped. Elec.* 3(2):32-35.
- Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from parmigiano reggiano cheese. *Lait.* 85:193-204.
- Cordiés, J. L., Machado, R. A. L., Hamilton, C. M. L. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta médica.* 8(1):13-27.
- Cullors, J. S. (1992). Test for identifying antibiotic residues in milk: How well do they work?. *Vet. Med.* 87(12):1235-1241.

- Czeizel, A. E., Rockenbauer, M., Sorensen, H. T., Olsen, J. (2000). A teratological study of lincosamides. *Scand. J. Infect. Dis.* 32:579-580.
- Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43:164-167.
- Dalh, T. A., Midden, W. R., Hartman, P. E. (1989). Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxigen. *J. Bacteriol.* 171:2188-2194.
- Danielsen, M., Wind, A. A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* ssp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82:1-11.
- Davidson, B. E., Llanos, R. M., Cancilla, M. R., Redman, N. C., Hillier, A. J. (1995). Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *Int. Dairy Journal.* 5:763-784.
- Dawson, K. A., Langlois, B. E., Stahly, T. S., Cromwell, G. L. (1984). Some characteristics and antibiotic resistance of anaerobic bacteria from the ceca and colons of pigs fed chlortetracycline containing and unmedicated diets. *App. Environ. Microbiol.* 47(1):210-212.
- Delgadillo, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C., Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques En : Bactéries lactiques. De Roissart, H., Luquet, F. M. (Eds.). vol. 1, Loriga, France. pp. 25-27.
- Delgado, R. A. (1990). Los aminoglucósidos. *Rev. Acta Med.* 4(2):238-246.
- Delgado, S., Flórez, A. B., Mayo, B. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Curr. Microbiol.* 50:202-207.
- De Vuyst, L., Vandame, E. J. (1994). Antimicrobial potencial of lactic acid bacteria. En: Bacteriocins of lactic acid bacteria. De Vuyst, L., Vandame, E. J. (Eds.). Ed. Blackie Academic and professional, London. pp. 91-149.
- Dhawan, V. K., Thadepalli, H. (1982). Clindamycine: a review of fifteen years of experience. *Rev. Infect. Dis.* 4:1133-1153.
- Dodd, H. M., Gasson, M. J. (1994). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. En: Gasson, M. J., De Vos, W. M. (Eds.). Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Glasgow, United Kingdom. Ed. Blackie Academic and Professional. pp. 211-251.
- Doyle, P. M., Beuchat, R. L. (2007). Food Microbiology: fundamentals and frontiers. 3rd ed. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C., E.E.U.U. pp. 747-769.
- Dunne, C., O' Mahony, L., Murphy, E. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2):386S-392S.

- Edson, R. S., Terrell, C. L. (1999). The aminoglycosides. *Mayo Clin. Proc.* 74:519-528.
- Elkins, C. A., Mullis, L. B. (2004). Bile-mediated sensitivity in *Lactobacillus* species likely results from increased membrane permeability attributable to cholic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7200-7209.
- Ennis, H. L., Lubin, M. (1964). Cycloheximide: Aspects of inhibition of protein synthesis in mammalian cells. *Science.* 146:1474-1476.
- Escolar, J. M., Azanza, P. J. R., Sádaba, D. B., Honorato, P. J. (1998a). Macrólidos y lincosaminas. *Medicine.* 7(72):3337-3343.
- Escolar, J. M., Azanza, P. J. R., Sádaba, D. B., Honorato, P. J. (1998b). Tetraciclinas, cloranfenicol y fosfomicina. *Medicine.* 7(76):3524-3532.
- Food and drug administration (FDA). (2005). Memorandum: tolerance and/or safe levels of animal drug residues en milk (replaces M-I-03-9 (June 30, 2003) and identifies it as "inactive") and also identifies M-I-92-1 as "inactive". September 27.
- Fernández, E. E. (2000). Microbiología e inocuidad de los alimentos. 1^a ed. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México. pp. 43-60
- Flórez, B. A., Delgado, S., Mayo, B. (2005). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from cheese environment. *Can. J. Microbiol.* 51:51-58.
- Freeman, C. D., Klutman, N. E., Lamp, K. C. (1997). Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs.* 54:679-708.
- Fukuyama, M., Furuhashi, K., Oonaka, K., Hara, T., Sunakawa, K. (2001). Antibacterial activity of fosfomicin against the causative bacteria isolated from bacterial enteritis. *Jpn. J. Antibiot.* 53:522-531.
- García, I. J. A. (2007). Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- García, S. J. E., Fresnadillo, M. M. J., García, S. E. (1998). Antibióticos betalactámicos: concepto y clasificación. *Medicina.* 7(88):4108-4115.
- Gilliland, S. E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87:175-188.
- Gobernado, M. (2003). Fosfomicina. *Rev. Esp. Quimioterap.* 16:15-40.
- Gómez, G. A. C., Pérez, G. C., Blanco, R. M. T., Morán, D. F. J., Hurtado, M. C. (1998). Penicilinas. *Medicine.* 7(80):3707-3717.

- González del Llano, A., Rodríguez, A., Cuesta, P. (1996). Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening, analysis by HPLC. *J. Appl. Bacteriol.* 80:570-576.
- González, M. B. E., Gómez, T. M., Jiménez, S. Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *RESPYN.* 2(4):99-106.
- Gould, G. W. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *J. Food Prot. Suppl.* 82-86.
- Greenwood, D. (1992). Antibiotic: modes of action. En: Lambert, H., O'grady, P. *Antibiotic and chemotherapy.* 6^a ed. Churchill Livingstone, Londres. pp. 291-302.
- Hammes, P. W., Tichaczek, S. P. (1994). The potencial of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Lebensmittel-Untersuchung und-forsching.* 198:193-201.
- Harris, L. J., Fleming, H. P., Klaenhammer, T. R. (1992). Developments in nisin research. *Food Res. Int.* 25:57-66.
- Herrero, M., Mayo, B., González, B., Suárez, J. E. (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 81:565-570.
- Herreros, M. A., Sandoval, H., González, L., Castro, J. M., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E. (2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiol.* 22:455-459.
- Honore, N., Cole, S. (1994). Streptomycin resistance in micobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 38:238-242.
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci.* 49:139-150.
- Hughenoltz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:165-178.
- Hummel, S. A., Hertel, C., Holzappel, H. W., Franz, C. M. A. E. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:730-739.
- Hutkins, R. W., Ellefson, W. L., Kashket, E. R. (1987). Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2275-2281.
- Jay, J. M. (2000). *Microbiología moderna de los alimentos.* 4^a ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 19-27, 106-108, 441-475.

- Johnston, M. A., Delwiche, E. A. (1965). Distribution and characteristics of the catalases of *Lactobacillaceae*. J. Bacteriol. 90:347-357.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 49:209-224.
- Kaneko, T., Suzuki, H., Takahashi, T. (1987). The effects of metal ions on diacetyl production by *Streptococcus lactis* subesp. *diacetylactis* 3022. Agric. Biol. Chem. 51:2315-2320.
- Katla, K. A., Krusc, H., Johnsen, H., Herikstad, H. (2001). Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. Int. J. Food Microbiol. 67:147-152.
- Katzung, B. G. (2005). Farmacología básica y clínica. 10^a ed. Ed. El Manual Moderno. México, D. F. pp. 459-464.
- Keukens, H. J., Erts, M. M. L., Traag, W. A. (1992). Analytical strategy for the regulatory control of residues of chloramphenicol in mead: preliminary studies in milk. J. of AOAC International. Vol. 75, N° 2.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12:39-86.
- Klein, G., Hallmann, C., Casas, L. A., Abad, J., Louwers, J., Reuter, G. (2000). Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. J. Appl. Microbiol. 89:815-824.
- Knothe, H., Schafer, V., Sammann, A., Shah, P. M. (1991). Influence of fosfomycin on the intestinal and pharyngeal flora of man. Infection. 19:18-20.
- Konings, W. N., Otto, R. (1983). Energy, transduction and solute transport in streptococci. Antonie Van Leeuwenhoek. 49:247-255.
- Korkeala, H., Soback, S., Hirin, J. (1984). Effect of cadmium on the growth of *Lactobacillus lactis*, *Lb. helveticus* and *Streptococcus thermophilus* in milk. J. Dairy Res. 51:591-596.
- Kucers, A. (1980). Current position of chloramphenicol in chemotherapy. J. Antimicrob. Chemother. 6:1-9.
- Land, K. M., Johnson, P. J. (1999). Molecular basis of metronidazole in resistance in pathogenic bacteria and protozoa. Drug Resist. Updat. 2:289-294.
- Lanosa, R. A. (1997). Enfoque diagnóstico del paciente séptico. Arch, Med. Int. 19(1):27-34.

- Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 34:482-492.
- Ledesma, O. V., De Ruíz, H. A. (1977). Asynthetic medium for comparative studies of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 42:123-133.
- Lell, B., Kremsner, G. P. (2002). Minireview. Clindamycin as an antimalarial drug: review of clinical trials. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 46(8):2315-2320.
- Leveau, J. Y., Bouix, M. (2000). Microbiología industrial: Los microorganismos de interés industrial. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 167-187, 206, 227-242.
- Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87:149-164.
- Lou, L. G., Xu, B. (1997). Alpha-anordrin-induced apoptosis of leukemia K562 cells is not prevented by cicloheximide. *Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, China.* 18(2):169-172.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos. 10ª ed. Ed. Prentice Hall. Madrid, España. pp. 122, 352, 400-402, 991.
- Magariños, H. H. (2000). Producción higiénica de la leche cruda, una guía para la pequeña y mediana empresa. Ed. Producción y Servicios Incorporados S.A., Guatemala, Guatemala. pp. 53-58.
- Marshall, V. M. E., Law, B. A. (1984). The physiology and growth of dairy lactic-acid bacteria. En: *Advances in the Microbiology and the Biochemistry of Cheese and fermented Milk.* Davies, F. L., Law, B. A. (Eds.). Elsevier Appl. Sci. Pub. 3:67-98.
- Martinez, V., Caumes, E., (2001). Metronidazole. *Ann dermatol venerol.* 128:903-909.
- Mäyra-Mäkinen, A., Briget, M. (1993). Industrial use and production of lactic acid bacteria. En: *Lactic acid bacteria.* Salminen, S., Von Wright, A. (Eds.). Marcel Dekker, New York. pp. 65-89.
- McEwen, S. A., Black, W. D., Meek, A. H. (1992). Antibiotic residues (bacterial inhibitory substances) in the milk of cow treated under label and extra-label conditions. *Can. Vet. J.* 33:527-534.
- Medina, M., Gaya, P., Nuñez, M. (1992). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas. *Revista española de lechería.* 2:28-32.
- Mejía, R. J. A., Chacón, R. Z., Guerrero, C. B., Otoniel, R. J., López, C. G. (2007). Obtención de cepas de *Lactobacillus*. Caracterización in-vitro como potenciales probióticas. *Rev. Científica, FCV-LUZ.* 17 (2):178-185.

- Muriana, P. M. (1996). Bacteriocins for control of *Lísteria* spp. in food. *J. Food Prot.* 56:54-63.
- Neria, P. A. (2006). Evaluación de la capacidad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Oh, S. J., Lim, K. S., Huh, C. S., Baek, Y. J. (1996). Effects of antibiotics residues on the growth of lactic culture in milk. *Korean J. Dairy Sci.* 18(1):25-30.
- Orla-Jensen, S. (1919). The lactic acid bacteria. Andr. Fred. Host and son., Copenhagen.
- Ortiz, B. M. (2006). Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Paik, H. D., Bae, S. S., Park, S. H., Pan, J. G. (1997). Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. *Journal of Industrial Microbiol. and Biotechnol.* 19:294-298.
- Patel, S. S., Balfour, J. A., Bryson, H. M. (1997). Fosfomicin tromethamine. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections. *Drugs.* 53(4):637-656.
- Pérez-Trallero, E., Iglesias, L. (2003). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21(9):520-529.
- Piard, J. C., Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by latic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 71:525-541.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. (1999). *Microbiología*. 4ª ed., Ed. McGraw-Hill Interamericana. Zaragoza, España. pp. 515-518.
- Raether, W., Panel, H. (2003). Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitol Res.* 90:19-39.
- Ramírez, C. M. (2005). Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Requena, T., Peláez, C. (1995). Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 35:19-44.
- Rodríguez, R. M. A., González-Piñera, J. G., Barreto, P. J., Lim, A. N., Areu, A., Pardo, N. A. (1998). Tetraciclinas. *Acta médica.* 8(1):75-79.

Rojo-Bezares, B., Saénz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. (2006). Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strain isolated from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 111:234-240.

Ross, J. I., Snelling, A. M., Eady, E. A., Cove, J. H., Cunliffe, W. J., Leyden, J. J. (2001). Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients attending dermatology clinics in Europe, U. S. A., Japan and Australia. *Br. J. Dermatol.* 144:339-346.

Samuelson, J. (1999). Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrobiot. Agents. Chemother.* 43:1533-1541.

San Martín, N. B., Moraga, R. (1996). Evaluación de la técnica microbiológica con Bacilos Subtilis BGA para la identificación de residuos de antimicrobianos en leche bovina. *Avances en ciencias veterinarias.* 11(1):1-10.

Scheiffmann, A. P., Schuertz, M., Weisner, H. U. (1992). False negative and positive results in testing for inhibitory substance in milk. The influence of antibiotic residues in bulk milk on Lactic acid production of starter cultures. *Milchwissenschaft.* 47(11): 712-715.

Schonbrunn, E., Sack, S., Eschenburg, S. (1996). Crystal structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase, the target of the antibiotic fosfomycin. *Structure.* 4:1065-1075.

Sischo, W. M., Burns, B. S. (1993). Field trial of four cowside antibiotic residue screening tests. *Ja. Vma.* pp. 1249-1254.

Sischo, W. M. (1996). Quality milk and test for antibiotic residues. *J. Dairy Sci.* 79(6):1065-1073.

Skarzynski, T., Mistry, A., Wonacott, A., Hutchinson, S., Kelly, V. A., Duncan, K. (1996). Structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomycin. *Structure.* 4:1465-1474.

Stamer, J. R. (1979). The lactic acid bacteria. *Microbes of diversity.* Food technol. 33 (1):60-65.

Sttepani, J. A. (1984). The hazard of using chloramphenicol in food animal. *J. Am. Vet. Met. Assoc.* 184:930-931.

Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* *Int. J. Gen. M.* 70:331-345.

Surawicz, C. M., Elmer, G. W., Speelman, P., McFarland, L. V., Chinn, J., Van Belle, G. (1989). Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology.* 96:981-988.

- Swenson, J. M., Facklam, R. R., Thornsberry, C. (1990). Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactobacillus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:543-549.
- Tankanow, R. M., Ross, M. B., Ertel, I. J., Dickinson, D. G., McCormick, L. S., Garfinkel, J. F. (1990). A double-blind, placebo-controlled study of efficacy of Lactinex in the prophylaxis of amoxicillin-induced diarrhea. *DICP.* 24:382-384.
- Thomas, T. D., Batt, R. D. (1968). Survival of *Streptococcus lactis* in the starvation conditions. *J. Gen. Microbiol.* 50:367-382.
- Thomas, T. D., Pritchard, G. G. (1987). Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:245-268.
- Thompson, B. I. (1987). Cephalosporin, carbapenem and momobactam antibiotics. *Mayo Clin. Proc.* 62:821-832.
- Tornadijo, M. E., Marra, A. I., García Fontán, M. C., Prieto, B., y Carballo, J. (1998). La calidad de la leche destinada a la fabricación de queso: calidad química. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2(2):79-91.
- Tremaine, C. S., Mills, I. A. (1987). Inadequacy of the eucaryote inhibitor cycloheximide in studies of protozoan grazing on bacteria at the freshwater-sediment interface. *Applied and environmental microbiology.* 53(8):1969-1972
- Tseng, C. P., Montville, T. J. (1993). Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: causes and consequences. *Biotechnol. Prog.* 9:113-121.
- Upcroft, P., Upcroft, J. A. (2001). Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:150-164.
- Vandenbergh, P. A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:221-238.
- Vedamuthu, E. R. (1994). The dairy *Leuconostoc*: Use in dairy products. *J. Dairy Sci.* 77:2725-2737.
- Velasco, Z. Ma. E., Yamasaki, M. A. (2002). Bacterias de interés veterinario. *Med. Vet.* 19(1):1-11.
- Walter, C. B., Karpinia, K., Baehni, P. (2004). Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. *Periodontology 2000.* 36:146-165.
- Walker, S. T. (2000). *Microbiología.* 1ª ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. pp. 301-302
- Weisblum, B. (1995). Minireview: erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 39(3):577-585.

- Wood, B. J. B., Holzapel, W. H. (1995). The genera of lactic acid acteria. 1ª ed. Ed. Blackie Academic & professional vol. 2. pp:1-12, 320-324.
- Wright, A. J. (1999). The penicillins. Mayo Clin. Proc. 74:290-307.
- Young, R. J., Huffmans, S. (2003). Probiotics use in children. J. Pediatr Health Care. 17:277-283.
- Yunis, A. A. (1989). Cloramphenicol toxicity: 25 years of research. Am. J. Med. 261:1318-1321.
- Zarazaga, M., Sáenz, Y., Portillo, A., Tenorio, C., Ruiz-Larrea, F., Del Campo, R., Baquero, F., Torres, C. (1999). In vitro activities of ketolide HMR 3647, macrolides, and other antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* isolates. Antimicrob. Agents chemother. 43:3039-3041.
- Zhou, J. S., Pillidge, C. J., Gopal, P. K., Gill, H. S. (2005). Antibiotics susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. Int. J. Food Microbiol. 98:211-217.
- Zuckerman, J. M., Kaye, K. M. (1995). The newer macrolides. Azitromycin and Clatithromycin. Infect. Dis. NA. 9(3):731-745.
- Zurich, L., San Martín, B. (1994). Residuos antimicrobianos en leche. Monografías de medicina veterinaria. 16(1-2):1-10.

10. Anexos

1. Media de los halos de inhibición y desviación estándar para las cepas de BAL por cada concentración del antibiótico evaluado.

Cepa	Concentración (µg/mL)	Diámetro de inhibición en mm para antibióticos inhibidores de la síntesis de:											
		ADN	Pared celular				Proteínas						
		Metro	Amoxi	Ampi	Fosfo	Peni	Cicl	Clin	Cloran	Clort	Eritro	Estrep	Tetra
<i>Lactobacillus plantarum</i> 0110	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10.33 (0.58)	ND	ND	ND
	10	ND	14.67 (0.58)*	18.67 (2.31)	ND	ND	ND	ND	ND	23.00 (2.00)	14.00 (0.00)	ND	15.67 (1.53)
	100	ND	26.67 (3.06)	27.33 (2.08)	ND	21.00 (2.65)	ND	ND	14.00 (2.65)	30.00 (0.00)	18.67 (1.53)	ND	25.00 (2.65)
	1000	ND	33.67 (1.53)	33.00 (2.65)	20.33 (1.53)	30.00 (1.00)	ND	ND	27.67 (2.31)	37.00 (2.65)	23.00 (1.00)	11.67 (2.08)	32.33 (2.52)
<i>Lb. plantarum</i> 0508	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10.67 (1.53)	ND	ND	ND
	10	ND	12.00 (0.00)	12.67 (1.53)	ND	14.67 (1.15)	ND	ND	ND	20.33 (0.58)	ND	ND	14.67 (0.58)
	100	ND	14.33 (2.08)	22.67 (0.58)	ND	23.33 (1.15)	ND	ND	14.67 (2.52)	28.33 (0.58)	14.67 (0.58)	ND	21.67 (0.58)
	1000	ND	25.33 (2.31)	27.00 (2.00)	ND	27.33 (1.53)	ND	12.00 (1.00)	23.67 (3.21)	33.67 (1.53)	16.33 (0.58)	13.67 (1.53)	27.33 (2.08)
<i>Lb. plantarum</i> 1509	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.00 (0.00)	10.00 (1.00)	ND	ND
	100	ND	14.00 (1.00)	16.67 (1.53)	ND	25.00 (0.00)	ND	12.67 (0.58)	8.33 (1.53)	24.67 (2.53)	22.00 (1.00)	ND	12.33 (2.31)
	1000	ND	26.33 (2.08)	29.67 (1.53)	ND	37.33 (2.08)	ND	22.33 (2.08)	25.33 (1.15)	34.00 (1.00)	24.00 (0.00)	8.67 (0.58)	23.00 (1.00)
<i>Lb. plantarum</i> 1607	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	18.33 (3.51)	15.33 (2.08)	ND	ND	ND	ND	ND	11.00 (2.00)	10.00 (1.00)	ND	ND
	100	ND	25.00 (1.73)	22.33 (0.58)	ND	11.30 (0.58)	ND	ND	10.67 (2.31)	22.00 (0.00)	17.33 (1.53)	ND	18.00 (0.00)
	1000	ND	33.00 (2.00)	26.00 (1.00)	ND	21.33 (2.52)	ND	9.67 (0.58)	24.33 (2.08)	27.67 (1.15)	20.67 (2.89)	8.00 (1.73)	24.00 (1.73)

Metro=metronidazol, Amoxi=amoxicilina, Ampi=ampicilina, Fosfo=fosfomicina, Peni=penicilina, Ciclo=cicloheximida, Clin=clindamicina, Cloran=cloranfenicol, Clort=clorotetraciclina, Eritro=eritromicina, Estrep=estreptomicina y Tetra=tetraciclina. *(Desv. estándar).

10. 1. (Continuación). Media de los halos de inhibición y desviación estándar para las cepas de BAL por cada concentración del antibiótico evaluado.

Cepa	Concentración (µg/mL)	Diámetro de inhibición en mm para antibióticos inhibidores de la síntesis de:											
		ADN	Pared celular				Proteínas						
		Metro	Amoxi	Ampi	Fosfo	Peni	Cicl	Clin	Cloran	Clort	Eritro	Estrep	Tetra
<i>Lb. plantarum</i> 1803	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.00 (2.00)	ND	ND	ND
	10	ND	12.33 (2.08)*	12.00 (0.00)	ND	11.67 (1.53)	ND	ND	ND	21.67 (0.58)	ND	ND	ND
	100	ND	19.67 (2.31)	21.67 (0.58)	ND	21.67 (1.15)	ND	8.67 (2.52)	14.67 (3.21)	26.00 (1.00)	14.00 (1.00)	7.67 (0.58)	ND
	1000	ND	27.00 (1.73)	27.33 (2.52)	ND	27.67 (2.08)	ND	15.33 (1.53)	23.67 (2.08)	31.00 (3.00)	16.67 (0.58)	15.00 (1.73)	9.67 (2.08)
<i>Lb. plantarum</i> 2102	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14.00 (2.65)	8.00 (1.00)	ND	ND
	100	ND	14.00 (1.73)	18.33 (1.53)	ND	19.33 (1.15)	ND	13.00 (2.00)	12.00 (0.00)	25.67 (1.15)	16.00 (2.00)	ND	16.67 (1.53)
	1000	ND	23.33 (1.53)	23.00 (1.00)	ND	29.67 (0.58)	ND	20.00 (2.00)	23.33 (2.89)	32.00 (2.00)	20.00 (1.00)	ND	26.67 (0.58)
<i>Lb. pentosus</i> 0506	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11.00 (1.00)	ND	ND	ND
	10	ND	13.00 (1.73)	14.33 (0.58)	ND	13.33 (1.53)	ND	ND	ND	21.00 (1.00)	ND	ND	14.00 (0.00)
	100	ND	22.00 (2.00)	22.33 (1.53)	ND	17.00n (2.31)	ND	7.67 (1.15)	11.67 (0.58)	28.67 (0.58)	12.00 (0.00)	ND	22.67 (0.58)
	1000	ND	26.67 (0.58)	28.67 (2.31)	ND	26.00 (2.52)	ND	12.33 (1.15)	21.67 (2.08)	32.33 (1.53)	15.00 (1.73)	11.67 (1.53)	28.67 (1.15)
<i>Lb. rhamnosus</i> 2306	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	ND	13.67 (2.52)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	100	ND	13.00 (2.00)	24.67 (1.15)	ND	15.33 (0.58)	ND	7.33 (0.58)	10.67 (3.21)	20.33 (0.58)	15.33 (0.58)	ND	11.67 (0.58)
	1000	ND	22.67 (2.08)	31.67 (2.08)	ND	26.33 (2.31)	ND	14.00 (0.00)	23.67 (2.08)	29.00 (0.00)	22.00 (1.73)	ND	19.67 (2.52)

Metro=metronidazol, Amoxi=amoxicilina, Ampi=ampicilina, Fosfo=fosfomicina, Peni=penicilina, Ciclo=cicloheximida, Clin=clindamicina, Cloran=cloranfenicol, Clort=clortetraciclina, Eritro=eritromicina, Estrep=estreptomicina y Tetra=tetraciclina. *(Desv. estándar).

10. 1. (Continuación). Media de los halos de inhibición y desviación estándar para las cepas de BAL por cada concentración del antibiótico evaluado.

Cepa	Concentración µg/mL	Diámetro de inhibición en mm para antibióticos inhibidores de la síntesis de:											
		ADN	Pared celular				Proteínas						
		Metro	Amoxi	Ampi	Fosfo	Peni	Cicl	Clin	Cloran	Clort	Eritro	Estrep	Tetra
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i> 0104	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	13.00 (1.00)*	13.67 (0.58)	ND	15.33 (2.31)	ND	ND	ND	ND	7.33 (0.58)	ND	ND
	100	ND	20.33 (0.58)	22.33 (1.15)	ND	20.33 (0.58)	ND	8.33 (2.31)	13.33 (1.15)	9.67 (0.58)	12.00 (0.00)	11.33 (1.15)	ND
	1000	ND	26.00 (1.73)	28.33 (2.31)	ND	25.33 (1.53)	ND	16.67 (1.15)	22.67 (1.15)	16.67 (1.53)	16.00 (1.00)	18.00 (1.73)	9.00 (2.65)
<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i> 0209	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	ND	8.33 (0.58)	ND	ND	ND	ND	ND	17.33 (0.58)	10.33 (2.89)	ND	ND
	100	ND	15.67 (1.53)	21.00 (1.00)	ND	17.33 (0.58)	ND	ND	10.33 (1.53)	25.33 (0.58)	17.00 (1.73)	ND	16.33 (2.89)
	1000	ND	26.00 (2.65)	28.33 (3.06)	ND	25.67 (0.58)	ND	15.67 (2.08)	21.00 (1.00)	31.67 (0.58)	20.00 (1.00)	17.67 (0.58)	27.33 (1.53)
<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i> 1801	1	ND	ND	11.67 (1.15)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	16.00 (0.00)	21.67 (2.08)	ND	ND	ND	ND	ND	12.33 (2.89)	10.00 (0.00)	ND	ND
	100	ND	27.33 (1.53)	27.67 (2.52)	ND	25.00 (1.73)	ND	17.33 (1.15)	9.33 (0.58)	22.67 (2.08)	16.00 (1.00)	ND	14.00 (2.65)
	1000	ND	35.00 (3.00)	36.67 (2.08)	ND	31.33 (2.52)	ND	23.00 (1.73)	22.67 (2.31)	29.33 (1.53)	20.00 (1.00)	10.33 (1.53)	24.00 (2.65)
<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i> 1802	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	ND	20.67 (0.58)	ND	13.33 (1.15)	ND	ND	ND	18.00 (1.00)	8.33 (2.52)	ND	ND
	100	ND	16.33 (0.58)	27.67 (0.58)	ND	20.33 (1.53)	ND	12.00 (2.00)	10.00 (1.00)	27.00 (1.73)	15.00 (0.00)	8.33 (0.58)	19.33 (0.58)
	1000	ND	23.33 (2.08)	34.33 (0.58)	ND	25.33 (2.08)	ND	17.33 (2.52)	19.67 (2.52)	32.67 (1.53)	18.67 (1.53)	15.67 (1.15)	26.00 (0.00)

Metro=metronidazol, Amoxi=amoxicilina, Ampi=ampicilina, Fosfo=fosfomicina, Peni=penicilina, Ciclo=cicloheximida, Clin=clindamicina, Cloran=cloranfenicol, Clort=clorotetraciclina, Eritro=eritromicina, Estrep=estreptomicina y Tetra=tetraciclina. *(Desv. estándar).

10. 1. (Continuación). Media de los halos de inhibición y desviación estándar para las cepas de BAL por cada concentración del antibiótico evaluado.

Cepa	Concentración µg/mL	Diámetro de inhibición en mm para antibióticos inhibidores de la síntesis de:											
		ADN	Pared celular				Proteínas						
		Metro	Amoxi	Ampi	Fosfo	Peni	Cicl	Clin	Cloran	Clort	Eritro	Estrep	Tetra
<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i> 2106	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	17.33 (2.58)	11.33 (2.31)	ND	ND
	100	ND	14.00 (2.65)	20.67 (1.53)	ND	18.00 (1.73)	ND	11.33 (1.53)	12.67 (2.20)	27.67 (0.58)	18.00 (1.73)	ND	18.00 (1.00)
	1000	ND	23.33 (2.08)	30.67 (1.15)	ND	28.00 (1.73)	ND	20.00 (2.00)	23.67 (2.31)	36.33 (0.58)	22.00 (2.00)	8.00 (2.00)	25.67 (3.06)
<i>Leuc. pseudomesenteroides</i> 2509	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	ND	17.00 (1.00)	ND	ND	ND	ND	ND	11.33 (1.15)	7.67 (1.15)	ND	ND
	100	ND	19.33 (1.16)	28.67 (2.31)	ND	19.00 (1.00)	ND	ND	10.00 (1.00)	24.00 (2.00)	18.67 (1.15)	ND	20.00 (1.00)
	1000	ND	27.67 (1.53)	35.67 (2.31)	ND	25.67 (0.58)	ND	11.67 (0.58)	22.33 (1.53)	31.00 (1.73)	20.67 (1.15)	11.33 (2.52)	25.00 (2.65)
<i>Leuc. pseudomesenteroides</i> 2510	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	ND	17.33 (2.52)	ND	11.33 (1.15)	ND	ND	ND	15.00 (2.52)	10.67 (1.15)	ND	ND
	100	ND	17.67 (0.58)	29.33 (2.31)	ND	22.00 (1.73)	ND	10.00 (3.00)	8.67 (2.08)	29.67 (2.52)	19.67 (1.15)	ND	19.00 (1.00)
	1000	ND	28.00 (2.65)	37.00 (2.65)	ND	32.67 (2.52)	ND	19.67 (0.58)	21.33 (1.15)	35.33 (1.15)	24.67 (2.08)	13.00 (1.73)	27.67 (2.08)

Metro=metronidazol, Amoxi=amoxicilina, Ampi=ampicilina, Fosfo=fosfomicina, Peni=penicilina, Ciclo=cicloheximida, Clin=clindamicina, Cloran=cloranfenicol, Clort=clortetraciclina, Eritro=eritromicina, Estrep=estreptomina y Tetra=tetraciclina. *(Desv. estándar).

10. 1. (Continuación). Media de los halos de inhibición y desviación estándar para las cepas de BAL por cada concentración del antibiótico evaluado.

Cepa	Concentración µg/mL	Diámetro de inhibición (mm) antibióticos inhibidores de la síntesis de:											
		ADN	Pared Celular				Proteínas						
		Metro	Amoxi	Ampi	Fosfo	Peni	Cicl	Clin	Cloran	Clort	Eritro	Estrep	Tetra
<i>Lactococcus lactis</i> 0103	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	13.00 (1.00)	12.00 (2.65)	ND	13.33 (0.58)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	100	ND	18.67 (0.58)	23.00 (1.00)	ND	18.33 (0.58)	ND	8.00 (1.73)	13.33 (1.53)	10.67 (1.15)	13.00 (1.00)	7.33 (0.58)	ND
	1000	ND	21.33 (1.16)	28.00 (1.00)	ND	22.67 (2.08)	ND	16.33 (1.15)	23.33 (2.08)	18.00 (0.00)	16.00 (1.00)	15.00 (1.00)	10.33 (2.89)
<i>Lc. lactis</i> 0603	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10.67 (2.52)	ND	ND	ND
	10	ND	15.00 (0.00)	14.67 (0.58)	ND	14.67 (0.58)	ND	ND	ND	22.00 (1.00)	8.67 (1.15)	ND	10.00 (0.00)
	100	ND	24.33 (2.08)	24.00 (1.73)	ND	21.00 (1.00)	ND	7.00 (0.00)	13.33 (1.15)	29.67 (0.58)	14.00 (1.00)	7.67 (2.52)	15.00 (1.73)
	1000	ND	28.67 (1.53)	29.67 (1.15)	ND	25.67 (0.58)	ND	15.67 (1.15)	24.33 (0.58)	34.33 (0.58)	17.00 (1.73)	14.00 (2.65)	27.33 (2.08)
<i>Lc. lactis</i> 0605	1	ND	ND	10.67 (0.58)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	12.67 (0.58)	21.67 (2.31)	ND	13.67 (1.53)	ND	ND	ND	22.00 (2.00)	ND	ND	15.33 (0.58)
	100	ND	20.33 (0.58)	29.00 (1.00)	ND	20.67 (2.08)	ND	ND	12.67 (2.08)	30.00 (1.00)	13.00 (1.00)	ND	21.67 (1.53)
	1000	ND	24.33 (1.53)	35.33 (1.53)	ND	27.67 (2.52)	ND	14.67 (2.08)	24.00 (2.00)	34.00 (1.00)	17.00 (1.00)	11.67 (1.53)	28.00 (1.73)
<i>Lc. raffinolactis</i> 0107	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.00 (1.00)	ND	ND	ND
	10	ND	12.33 (2.31)	14.00 (2.00)	ND	16.67 (3.51)	ND	ND	ND	22.33 (2.08)	ND	ND	13.67 (0.58)
	100	ND	17.67 (2.31)	22.33 (0.58)	ND	22.67 (1.15)	ND	7.00 (0.00)	14.33 (1.15)	27.67 (0.58)	12.67 (0.58)	ND	22.00 (1.00)
	1000	ND	22.67 (1.53)	28.67 (2.31)	ND	27.33 (1.53)	ND	12.33 (0.58)	22.00 (1.00)	33.67 (2.31)	16.33 (1.53)	14.00 (1.00)	28.67 (1.15)

Metro=metronidazol, Amoxi=amoxicilina, Ampi=ampicilina, Fosfo=fosfomicina, Peni=penicilina, Ciclo=cicloheximida, Clin=clindamicina, Cloran=cloranfenicol, Clort=clorotetraciclina, Eritro=eritromicina, Estrep=estreptomicina y Tetra=tetraciclina. *(Desv. estándar).

10. 1. (Continuación). Media de los halos de inhibición y desviación estándar para las cepas de BAL por cada concentración del antibiótico evaluado.

Cepa	Concentración µg/mL	Diámetro de inhibición (mm) antibióticos inhibidores de la síntesis de:											
		ADN	Pared Celular				Proteínas						
		Metro	Amoxi	Ampi	Fosfo	Peni	Cicl	Clin	Cloran	Clort	Eritro	Estrep	Tetra
<i>Lc. raffinolactis</i> 1807	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	ND	ND	14.67 (3.06)	ND	ND	ND	ND	ND	19.67 (2.00)	8.67 (0.58)	ND	13.67 (2.08)
	100	ND	11.33 (0.58)	26.67 (1.15)	ND	15.67 (1.15)	ND	ND	12.67 (1.15)	30.67 (3.06)	18.00 (1.00)	ND	19.33 (1.15)
	1000	ND	22.33 (2.08)	36.33 (1.53)	ND	28.33 (2.52)	ND	13.00 (1.73)	23.00 (2.65)	38.67 (2.31)	21.00 (0.00)	19.00 (1.00)	25.00 (1.00)

Metro=metronidazol, Amoxi=amoxicilina, Ampi=ampicilina, Fosfo=fosfomicina, Peni=penicilina, Ciclo=cicloheximida, Clin=clindamicina, Cloran=cloranfenicol, Clort=clorotetraciclina, Eritro=eritromicina, Estrep=estreptomina y Tetra=tetraciclina. *(Desv. estándar).

Anexo 10. 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de antibióticos en la prueba de susceptibilidad frente a cepas de BAL.

Cepa	CMI ($\mu\text{g/mL}$) antibióticos inhibidores de la síntesis de:											
	ADN	pared celular				proteínas						
	Metro	Amoxi*	Ampi*	Fosfo	Peni*	Ciclo	Clin	Cloran	Cloro*	Eritro*	Estrep*	Tetra*
<i>Lb. plantarum</i> 0110	ND	10	10	1000	100	ND	ND	100	10	10	1000	10
<i>Lb. plantarum</i> 0508	ND	10	10	ND	10	ND	1000	100	1	100	1000	10
<i>Lb. plantarum</i> 1509	ND	100	100	ND	100	ND	100	100	10	10	1000	100
<i>Lb. plantarum</i> 1607	ND	10	10	ND	100	ND	1000	100	10	10	1000	100
<i>Lb. plantarum</i> 1803	ND	10	10	ND	10	ND	100	100	1	100	100	1000
<i>Lb. plantarum</i> 2102	ND	100	100	ND	100	ND	100	100	10	10	ND	100
<i>Lb. pentosus</i> 0506	ND	10	10	ND	10	ND	100	100	1	100	1000	10
<i>Lb. rhamnosus</i> 2306	ND	100	10	ND	100	ND	100	100	100	100	ND	100
<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i> 0104	ND	10	10	ND	10	ND	100	100	100	10	100	1000
<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i> 0209	ND	100	10	ND	100	ND	1000	100	10	10	1000	100
<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i> 1801	ND	10	1	ND	100	ND	100	100	10	10	1000	100
<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i> 1802	ND	100	10	ND	10	ND	100	100	10	10	100	100
<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>mesenteroides</i> 2106	ND	100	100	ND	100	ND	100	100	10	10	1000	100
<i>Leuc.pseudomesenteroides</i> 2509	ND	100	10	ND	100	ND	1000	100	10	10	1000	100
<i>Leuc.pseudomesenteroides</i> 2510	ND	100	10	ND	10	ND	100	100	10	10	1000	100
<i>Lactococcus lactis</i> 0103	ND	10	10	ND	10	ND	100	100	100	100	100	1000
<i>Lactococcus lactis</i> 0603	ND	10	10	ND	10	ND	100	100	1	10	100	10
<i>Lactococcus lactis</i> 0605	ND	10	1	ND	10	ND	1000	100	10	100	1000	10
<i>Lc. raffinolactis</i> 0107	ND	10	10	ND	10	ND	100	100	1	100	1000	10
<i>Lc. raffinolactis</i> 1807	ND	100	10	ND	100	ND	1000	100	10	10	1000	10

Metro=metronidazol, Amoxi=amoxicilina, Ampi=ampicilina, Fosfo=fosfomicina, Peni=penicilina, Ciclo=cicloheximida, Clin=clindamicina, Cloran=cloranfenicol, Clort=clorotetraciclina, Eritro=eritromicina, Estrep=estreptomicina y Tetra=tetraciclina.

* Antibióticos aprobados por la FDA (2005)