



# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

### ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS CON CAPACIDAD  
ANTAGÓNICA DE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus  
aureus* DE QUESOS FRESCOS EXPENDIDOS EN TRES**

**MERCADOS DE LA CIUDAD DE PUNO – 2017**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Br. JESUS MADONA CHURQUI VILCA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PUNO - PERÚ**

**2020**



## DEDICATORIA

*Dedico el trabajo a mis padres, en especial a mi padre que cuando estaba conmigo nunca dejo de creer en mí, a mis docentes por la enseñanza, dedicación y exigencia en que seamos más responsables y serios con nuestra carrera profesional de **BIOLOGÍA**, como también agradezco a mi hijo por su comprensión.*

**Jesús Madona**



## AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgen María que siempre me acompañan y guían mi camino.

A la Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias Biológicas y docentes que inculcaron en mi formación profesional.

A los docentes y personal administrativo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

A mis padres que, con su apoyo incondicional y sus buenos consejos, hicieron que yo no me deje vencer frente a tantos obstáculos que se me presentaron, aunque mi padre ya no este conmigo su recuerdo y sus consejos siempre estarán presentes.

A mi madre y mi hijo por su paciencia, apoyo y comprensión que día a día me demuestran, gracias por su apoyo incondicional.

A mi hermano por sus buenos deseos y consejos.

**Jesús Madona**



# ÍNDICE GENERAL

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**ÍNDICE GENERAL**

**ÍNDICE DE TABLAS**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

**RESUMEN .....10**

**ABSTRACT.....11**

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

**1.1 OBJETIVO GENERAL .....13**

**1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....13**

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

**2.1 ANTECEDENTES.....14**

**2.2 MARCO TEÓRICO .....16**

2.2.1 QUESO FRESCO.....16

2.2.2 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL).....21

2.2.3 ANTAGONISMO BACTERIANO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO  
LÁCTICAS (BAL).....23

2.2.4 BACTERIAS PATÓGENAS.....24

2.2.5 ANTIBIOGRAMA.....26

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**



<b>3.1</b>	<b>ZONA DE ESTUDIO.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>TIPO DE ESTUDIO .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>POBLACIÓN Y MUESTRA .....</b>	<b>29</b>
<b>3.4</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA CARGA DE BACTERIAS <i>Lactobacillus</i> SP EN QUESOS FRESCOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3.5</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE <i>Lactobacillus</i> SP SOBRE <i>Escherichia coli</i> Y <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO IV</b>		
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>		
<b>4.1</b>	<b>CARGA DE BACTERIAS <i>Lactobacillus</i> SP EN QUESOS FRESCOS .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>EFECTO ANTAGÓNICO DE <i>Lactobacillus</i> SP AISLADAS, SOBRE CEPAS DE <i>Escherichia Coli</i> Y <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>46</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>56</b>

**Área:** Ciencias Biomédicas.

**Línea:** Calidad Ambiental.

**FECHA DE SUSTENTACIÓN:** 29 de mayo 2020.



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición química de queso fresco (Van Hekken & Farkye, 2003).....	17
<b>Tabla 2.</b> Composición nutritiva de queso fresco (FAO, 2000).....	18
<b>Tabla 3.</b> Propiedades fisicoquímicas del queso fresco (Gonzáles, 2010).....	18
<b>Tabla 4.</b> Requisitos microbiológicos para quesos no madurados (queso fresco, mantecoso, ricota, cabaña, crema, petit suisse, mozzarella, ucayalino, otros) (NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01).....	18
<b>Tabla 5.</b> Gentamicina y diámetros críticos para <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> (INS, 2002). ....	27
<b>Tabla 6.</b> Distribución de muestras por mercado y meses de muestreo, realizado durante los meses de agosto a octubre del año 2017.....	29
<b>Tabla 7.</b> Recuento de bacterias <i>Lactobacillus</i> sp ( $\times 10^5$ UFC/g) en quesos frescos de los mercados de Puno, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.....	36
<b>Tabla 8.</b> Diámetros de halo de inhibición y porcentaje de inhibición de bacterias <i>Lactobacillus</i> sp en cepas patógenas, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.....	41
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza de los recuentos de <i>Lactobacillus</i> sp, según meses de muestreo, agosto – octubre 2017.....	57
<b>Tabla 10.</b> Análisis de varianza de los recuentos de <i>Lactobacillus</i> sp, según mercados muestreados, agosto – octubre 2017.....	58
<b>Tabla 11.</b> Análisis de varianza de los diámetros de halo de inhibición sobre <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> , agosto – octubre 2017.....	58
<b>Tabla 12.</b> Análisis de varianza de los diámetros de halo de inhibición de los tratamientos aplicados, agosto – octubre 2017.....	58



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Formación del coágulo de caseína (Udayarajan, 2007). .....	17
<b>Figura 2.</b>	Diagrama de flujo del queso fresco. (FAO, 1992).....	20
<b>Figura 3.</b>	Pruebas de susceptibilidad bacteriana a un antibiótico o antibiograma. ....	27
<b>Figura 4.</b>	Ubicación de los mercados en la ciudad de Puno, donde se muestrearon los quesos frescos, agosto – octubre 2017 (Googlemap, 2019). .....	28
<b>Figura 5.</b>	Procedimientos a realizar para la cuantificación de <i>Lactobacillus</i> sp (Madigan <i>et al.</i> , 2014).....	31
<b>Figura 6.</b>	Prueba de Tukey a los recuentos de <i>Lactobacillus</i> sp según meses de muestreo, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017. ....	37
<b>Figura 7.</b>	Prueba de Tukey a los recuentos de <i>Lactobacillus</i> sp según mercados de muestreo, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017. ....	38
<b>Figura 8.</b>	Diámetros de halos de inhibición bacteriana con gentamicina y <i>Lactobacillus</i> sp, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017. ....	42
<b>Figura 9.</b>	Prueba de Tukey a los recuentos de <i>Lactobacillus</i> sp según mercados de muestreo, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017. ....	42
<b>Figura 10.</b>	Prueba de Tukey a los recuentos de <i>Lactobacillus</i> sp según mercados de muestreo, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017. ....	43
<b>Figura 11.</b>	Adquisición de quesos frescos en los mercados de la ciudad de Puno, agosto – octubre 2017. ....	56



<b>Figura 12.</b> Preparación de los recuentos bacteriano en quesos, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.....	56
<b>Figura 13.</b> Crecimiento de bacterias lácticas, <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.....	56
<b>Figura 14.</b> Preparación de las diluciones de McFarlan para las pruebas antagónicas, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.....	57
<b>Figura 15.</b> Antagonismo de bacterias acidolácticas sobre <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> , laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.....	57





## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

% :	porcentaje
µg :	microgramos
BAL :	bacterias ácido lácticas
CV :	coeficiente de variabilidad
DE :	desviación estándar
<i>et al.</i> :	y colaboradores
FCCBB : F	acultad de Ciencias Biológicas
ml :	mililitro
mm :	milímetros
n :	tamaño de muestra
sp :	especie
UFC/g :	unidades formadoras de colonias por gramo
UNA – Puno :	Universidad Nacional del Altiplano de Puno
Φ :	diámetro



## RESUMEN

La investigación se realizó en la ciudad de Puno, durante agosto a octubre del 2017, en razón de que los quesos frescos expendidos en los mercados, poseen altos contenidos de bacterias contaminantes, producto de la falta de higiene en su elaboración, y que ante ello existen bacterias benéficas capaces de mitigar su crecimiento. Los objetivos fueron: a) evaluar la carga de bacterias *Lactobacillus* sp en quesos frescos expendidos en los mercados Unión y Dignidad, Central y Laykakota de la ciudad de Puno y b) evaluar el efecto antagónico de bacterias lácticas aisladas, sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los métodos fueron: la carga de *Lactobacillus* sp en quesos, se determinó mediante el método de recuento en placa y cultivo por extensión, manteniendo los cultivos puros; se aislaron hasta cultivo puro de *E. coli* y *S. aureus*, previamente identificadas mediante coloración Gram y pruebas bioquímicas, las pruebas antagónicas de *Lactobacillus* sp sobre las bacterias experimentales, se realizó mediante el método de antibiograma y el porcentaje de inhibición. Los resultados fueron: el recuento de *Lactobacillus* sp en quesos frescos varió entre  $1.57 \times 10^5$  UFC/g y  $2.97 \times 10^5$  UFC/g, siendo mayor en el mercado Unión y Dignidad y el mes de octubre, *Lactobacillus* sp presentó efecto antagónico sobre *E. coli* y *S. aureus*, con inhibiciones del 73.96 y 97.32%, respectivamente. Se concluyen en que las bacterias *Lactobacillus* sp están presentes en el queso fresco y poseen efecto antagónico sobre *E. coli* y *S. aureus*.

**Palabras clave:** efecto antagónico, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*.



## ABSTRACT

The research was carried out in the city of Puno, during August to October 2017, because fresh cheeses sold in the markets have high levels of contaminating bacteria, due to the lack of hygiene in their preparation, and that in light of this there are beneficial bacteria capable of mitigating their growth. The objectives were: a) to evaluate the load of bacteria *Lactobacillus* sp on fresh cheeses sold in the Unión and Dignidad, Central and Laykakota markets of the city of Puno and b) to evaluate the antagonistic effect of isolated lactic bacteria, on strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The methods were: the load of *Lactobacillus* sp in cheeses was determined by the plate count method and culture by extension, keeping the cultures pure; until pure culture of *E. coli* and *S. aureus*, previously identified by Gram staining and biochemical tests, the antagonistic tests of *Lactobacillus* sp on the experimental bacteria, were performed using the antibiogram method and the percentage of inhibition. The results were: the count of *Lactobacillus* sp in fresh cheeses varied between  $1.57 \times 10^5$  UFC/g and  $2.97 \times 10^5$  UFC/g, being higher in the Unión y Dignidad market and in October, *Lactobacillus* sp presented an antagonistic effect on *E. coli* and *S. aureus*, with inhibitions of 73.96 and 97.32%, respectively. They conclude that *Lactobacillus* sp bacteria are present in fresh cheese and have an antagonistic effect on *E. coli* and *S. aureus*.

**Keywords:** antagonistic effect, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*.



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La región Puno, posee actividad pecuaria produciendo leche y derivados lácteos como yogurt, queso, entre otros. La elaboración de quesos frescos para la venta diaria está expuesta a sufrir contaminación microbiana principalmente por bacterias patógenas como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, presentes en las heces y flora natural de la piel respectivamente, y ocasionan alteraciones fisiológicas en los consumidores, debido a su deterioro y producción de toxinas dañinas al ser humano.

Los quesos frescos que se comercializan a diario en los mercados de la ciudad de Puno, están expuestos al establecimiento de bacterias perjudiciales patógenas y que deterioran al producto lácteo, pero a su vez mantiene una flora benéfica que controla la población microbiana temporalmente, razón por la cual se desea indagar el efecto antagónico de las bacterias *Lactobacillus* sp aislados de los quesos frescos y evaluar su efecto sobre el crecimiento de bacterias *E. coli* y *S. aureus* procedentes del mismo queso.

La carga bacteriana patógena en quesos no madurados en el que se incluye el queso fresco se manifiesta en la NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01, pero no se contó con una normativa vigente que indique los valores normales del recuento de bacterias *Lactobacillus* sp en quesos, solo se comparó con cifras registradas en artículos científicos y tesis de graduación. Para determinar si hubo o no eficacia en el efecto antagónico, los halos de inhibición bacteriana originados por *Lactobacillus* sp fueron comparados con los halos estandarizados de los discos de sensibilidad de gentamicina 10 µg, recomendados por el Instituto Nacional de Salud, y así calcular el porcentaje de inhibición.

Por lo tanto, la investigación se planteó con la finalidad de determinar la cantidad de bacterias *Lactobacillus* sp y evaluar si poseen un efecto antagónico sobre el crecimiento de las bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y así definir las ventajas o desventajas del uso de esta propiedad antibacteriana ejercida por *Lactobacillus* en productos lácteos de nuestra región, especialmente en quesos. Por tal razón esta investigación tuvo los siguientes objetivos:



## 1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar bacterias del género *Lactobacillus* sp con capacidad antagónica de cepas patógenas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a partir de quesos frescos expendidos en tres mercados de la ciudad de Puno.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la carga de bacterias *Lactobacillus* sp en quesos frescos expendidos en los mercados Unión y Dignidad, Central y Laykakota de la ciudad de Puno.
- Evaluar el efecto antagónico de *Lactobacillus* sp aisladas, sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1 ANTECEDENTES

Hernández & Ayala (2018), al evaluar la composición fisicoquímica de queso fresco con por porcentajes de 2, 5 y 7% de aceituna verde sevillana (*Olea europea* L.), determinaron valores de acidez (% ácido láctico) de 0.14, 0.17 y 0.26 % respectivamente; Guerrero *et al.* (2017) encontraron en los quesos recuentos de bacterias ácido lácticas de  $3.88 \times 10^8$  y  $2.0 \times 10^4$  UFC/g, estos recuentos bajos serían debido probablemente a que algunas marcas muestreadas son quesos artesanales; González & Franco (2015), determinaron que la microbiota del queso de Aro que se comercializa en Oaxaca (México), estuvo conformada por microorganismos alterantes, patógenos y de importancia industrial, entre ellas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp, *Lactobacillus* sp y *Streptococcus* sp, estos últimos garantizan la producción de quesos inocuos; Jurado & Gúzman (2015), determinaron el efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* sobre *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*, aisladas de leche con mastitis subclínica, todas fueron sensibles excepto *E. coli* fue la única resistente a la cepa láctica. *L. casei*.

Peralta (2014), evaluó la actividad antagónica de bacterias ácido lácticas aisladas de queso fresco artesanal frente a *Listeria monocytógenes* y *Escherichia coli*, de 14 muestras de queso que analizó, los valores de los recuentos de bacterias ácido lácticas oscilaron entre  $4.5 \times 10^7$  UFC/g y  $4 \times 10^8$  UFC/g; Tapia (2014), realizó recuentos de bacterias probióticas en queso tipo Paria, luego de 7, 14, 21 y 28 días, donde *Lactococcus lactis* tuvo recuentos de  $18 \times 10^4$  UFC/g al día inicial y  $13 \times 10^5$  UFC/g al día 28, *Lactobacillus acidophilus* tuvo recuentos de  $22 \times 10^4$  UFC/g al día inicial y  $39 \times 10^5$  UFC/g al día 28; Garrido (2014), reportó valores de acidez en quesos, según sus componentes, 0.22% de ácido láctico en quesos con 100% leche de vaca, 0.23% en queso de 100% leche de cabra, 0.23% y 0.22% en queso mezclado 50-50 y 75-25 leche de vaca y cabra respectivamente; Zamora *et al.* (2012), evaluaron el efecto de la incorporación del probiótico *Saccharomyces boullardii* en queso fresco sobre la prevalencia de bacterias mesófilas aerobias (BMA), *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, coliformes totales (CT),



y mohos y levaduras, lográndolos inhibir, no tuvo efecto sobre *Salmonella spp* y *E. coli*.

Obando *et al.* (2010), evaluaron el efecto probiótico de bacterias ácido lácticas del queso Cottage y determinaron que *Bifidobacterium* presentó recuentos superiores a  $1 \times 10^6$  UFC/g al final de 14 días de vida útil; al tratar con *L. acidophilus* y *L. casei* registraron recuentos de  $1 \times 10^6$  UFC/g hasta los 21 días; no obstante *L. casei* perdió viabilidad en el tiempo; Duran *et al.* (2010), describieron rangos de acidez en quesos con rangos de 0.19% a 0.28% de ácido láctico; Romero *et al.* (2009), colectaron muestras de queso crema tropical, de cinco queserías de Tonalá (Chiapas – México) y evaluaron coliformes totales, *E. coli*, bacterias mesófilas aerobias y *Salmonella*, y parámetros fisicoquímicos, donde los quesos no cumplieron con las normas microbiológicas; Vallejo *et al.* (2009), estudiaron la actividad inhibitoria de 6 cepas de *Lactobacillus sp* aisladas de queso ovino sobre *Escherichia coli* O157:H7 y demostraron su inhibición debido a la producción de ácidos orgánicos como el ácido láctico, introduciéndose el término de biopreservación; Cástulo *et al.* (2008), aislaron bacterias ácido lácticas, a partir de quesos frescos, lograron inhibir a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* (Gram positivos) excepto a *Salmonella agona* (Gram negativo), debido al pH, los ácidos orgánicos y enzimas proteolíticas.

Viloche & Tito (2007), aislaron bacterias de *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* y *L. casei* a partir de productos de fermentación como son queso, yogurt y leche; Buriti *et al.* (2007), en queso Minas frescal probiótico, inoculado con una mezcla probiótica de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium animalis*, tuvieron viabilidad *L. acidophilus* estable con recuentos de  $10^8$  UFC/g, decreciendo a los 14 días; Corrales *et al.* (2007) en helado de vainilla adicionado *L. acidophilus* y *B. lactis*, inoculado con  $10^7$  UFC/g por cada microorganismo, luego de 85 días, tuvo un descenso de la población viable de ambos microorganismos, pero no fue inferior a  $10^6$ ; Batista (2006), en queso fresco típico en Brasil, Minas frescal, observaron poblaciones promedio de *Lactobacillus acidophilus* mayores a  $10^6$  UFC/g, luego de 14 días de maduración el recuento fue de  $10^7$  UFC/g y disminuye a  $10^6$  UFC/g luego de 21 días.

Ramírez (2005), aisló 293 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de quesos, el 24.57% mostraron actividad antibacteriana contra al menos uno de los microorganismos patógenos, inhibiendo bacterias Gram negativas, inhibieron *Listeria monocytogenes* Scott

su acción se debe a los compuestos antimicrobianos producidos; Cristóbal & Maurtua (2003), al evaluar la calidad bacteriológica de quesos frescos artesanales y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp, cuantificaron un promedio de  $1.6 \times 10^5$  UFC/g, las cuales oscilaron entre  $2.8 \times 10^2$  UFC/g y  $1.8 \times 10^6$  UFC/g de *Lactobacillus* spp; Soomro *et al.* (2002) determinaron que las bacterias acidolácticas producen ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno, la bacteriocina es producida por *Lactococcus lactis*, quienes inactivan o inhiben el crecimiento de especies de bacterias zoonóticas y productoras de toxiinfecciones alimentarias en el ser humano; Bouhnik (1993), sugiere que las bacterias lácticas ejerzan su acción como probióticos y deben llegar al intestino vivas y en una cantidad suficiente en valores de  $10^6 - 10^7$  UFC/ml, para que se puedan apreciar sus efectos y consigan adherirse, implantarse o multiplicarse en el tracto intestinal.

## 2.2 MARCO TEÓRICO

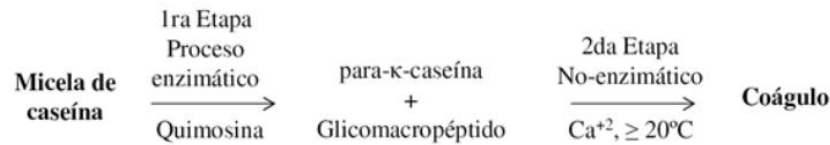
### 2.2.1 Queso fresco

La Norma Técnica Peruana (NTP) 202.195, define al queso fresco (tradicional), como queso blando, no madurado ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, sin cultivos lácteos, se obtiene mediante la separación del suero después de la coagulación de la leche previamente pasteurizada, entera, descremada o parcialmente descremada, o una mezcla de algunos de estos productos. Para Alais (1985), el queso es "una forma de conservación de la caseína y de la materia grasa de la leche, que se obtiene por coagulación de la misma seguida del desuerado, donde se separan, por un lado, el suero constituido por la mayor parte del agua y de los componentes solubles de la leche y, por otro, la cuajada que aún retiene una pequeña fracción del suero".

El queso es el producto de la coagulación de leche cruda o pasteurizada, constituido por caseína de la leche en forma de gel (Eck & Gillis, 2000), con este proceso se preserva el valor nutritivo de los componentes de la leche, que incluyen grasas, proteínas y constituyentes menores y genera un sabor especial y una consistencia sólida o semisólida al queso (Vélez, 2009). Scott *et al.* (2002), indica que el queso es el producto sólido o semisólido, madurado o fresco, donde el valor de la relación suero proteínas/caseína no supera al de la leche, y se obtiene por coagulación (total o parcial) de la leche mediante la acción del cuajo o de otros agentes coagulantes adecuados, con el posterior escurrido parcial del lactosuero (Figura 1). El proceso de elaboración del queso es bastante simple,



involucra fenómenos físicos y químicos muy complejos, que consiste en concentrar, la coagulación de la proteína caseína mediante la acción enzimática (cuajo) o por acción de un ácido (comúnmente ácido láctico) (Law & Tamime, 2011).



**Figura 1.** Formación del coágulo de caseína (Udayarajan, 2007).

Los quesos frescos poseen alta humedad y no pasa por un proceso de maduración, generalmente tiene sabor a leche fresca o leche acidificada, tiene una consistencia pastosa y su color blanco, la humedad que posee está entre 45 – 80 %, tiene una vida útil corta, por lo que debe ser consumido en pocos días, deben ser transportados a temperaturas de 4 – 10 °C (Villegas, 2009).

## Composición química del queso

**La caseína.** Es la proteína que aparece en el queso y es la más importante, también puede poseer la globulina y la albúmina que escapan con el suero, entre los azúcares se citan a la lactosa, que se transforma hasta ácido láctico por actividad de las bacterias lácticas. El suero liberado contiene toda la lactosa de la leche, posee sales minerales en 1.2% y 4.5% y mayoritariamente calcio, fósforo y hierro (Revilla, 1982), las vitaminas que poseen son solubles en grasa como las vitaminas A y D, la grasa es el mayor componente en los quesos (Walstra *et al.*, 2001). Según Van Hekken & Farkye (2003), el queso posee la siguiente composición química (Tabla 1):

**Tabla 1.** Composición química de queso fresco (Van Hekken & Farkye, 2003).

Análisis	Rangos
Humedad (%)	46-57
Grasa (%)	18-29
Proteína (%)	17-21
Sal	1.0-3.0
pH	6.1
Valor nutrimental (kcal/100g)	255 ± 37

La composición química del queso fresco según la Food and Agricultural Organization (FAO, 2000), es la que se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Composición nutritiva de queso fresco (FAO, 2000).

Nutriente	Contenido (%)
Grasa	24.0
Proteína	21.0
Carbohidrato	2.0
Sales minerales	2.0
Agua	50

En la siguiente Tabla 3 se muestra las propiedades fisicoquímicas del queso fresco:

**Tabla 3.** Propiedades fisicoquímicas del queso fresco (Gonzáles, 2010).

Propiedad	Medición
pH	5.4
Humedad (%)	45
Rendimiento (%)	11
Grasas (%)	20.5
Sólidos totales (%)	46.6
Cenizas (%)	3.5
Temperatura de congelación (°C)	-0.55
Tensión superficial (N/M)	50

Microbiológicamente los quesos frescos deben de cumplir con las características bacteriana presentadas en la Tabla 4:

**Tabla 4.** Requisitos microbiológicos para quesos no madurados (queso fresco, mantecoso, ricota, cabaña, crema, petit suisse, mozzarella, ucalino, otros) (NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01).

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g	
					m	M

Coliformes	5	3	5	2	$5 \times 10^2$	$10^3$
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	3	5	2	10	$10^2$
<i>Escherichia coli</i>	6	3	5	1	3	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	5	0	Ausencia / 25 g	--
<i>Salmonella sp</i>	10	2	5	0	Ausencia / 25 g	--

Etapas de elaboración de queso fresco (Figura 2):

- a. **Recepción de la Leche.** La leche debe ser de buena calidad, desde los puntos de vista químico y microbiológico (Madrid, 1996), tener la acidez requerida y libre de impurezas, necesaria filtrada para eliminar cuerpos extraños. De preferencia se debe realizar los análisis de acidez titulable, densidad, la estabilidad al alcohol, entre otras.
- b. **Pasteurizado.** La pasteurización es la higienización para eliminar la microflora patógena de la leche y destruir enzimas deterioradoras (Villegas, 2009); el calentamiento de la leche inicia con la reducción de coagulación por el cuajo, pero puede ser reversible al adicionar  $\text{CaCl}_2$  (Varnam & Sutherland, 1994).
- c. **Enfriado.** Se realiza para acondicionar la leche y lograr mejor rendimiento, la actividad del cuajo y la formación de la cuajada (Zambrano, 2010).
- d. **Coagulado.** Es el proceso de desestabilización proteica que se llevarse a cabo mediante la acción de proteínasas ácidas como la quimosina (coagulación enzimática) o por acidificación a un pH próximo al punto isoelectrico de las proteínas (Varnam & Sutherland, 1994). La coagulación enzimática tiene lugar en dos fases distintas, la proteolítica donde caseína se desestabilizan por hidrólisis, formándose micelas de paracaseína; mientras que la secundaria, está mediada por el calcio y las micelas de paracaseína se agregan y precipitan. Con el tiempo van formando una red con poros, dentro de la cual se van acomodando los glóbulos grasos y el coágulo se va haciendo más firme por la continua formación de enlaces entre las micelas (Zambrano, 2010).
- e. **Cortado y Batido.** En esta etapa debe evitarse la ruptura del coagulo, tampoco la pérdida de materia grasa y una deficiente sinéresis (Varnam & Sutherland, 1994), para los quesos frescos se trozan cubos de uno a dos cm, con ello se permite la salida de suero (Zambrano, 2010), luego la agitación o batido de la cuajada, al mantenerse entre  $38\text{ }^\circ\text{C}$  y  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , favorece la sinéresis y la eliminación del suero.

- f. **Desuerado.** Es la separación del suero de la cuajada mediante la filtración o decantación, el cual puede llegar a la separación del 90% del lactosuero (Varnam & Sutherland, 1994).
- g. **Salado.** Es un procedimiento realizado para lograr el sabor adecuado, facilita el desuerado de la cuajada e inhibe el crecimiento de bacterias no deseables, cuando se encuentra en concentraciones elevadas.
- h. **Moldeado.** Permite que los coágulos se compacten y formen una masa continua, manteniendo la textura y su forma definitiva del queso (Zambrano, 2010), puede haber orificios que permita salir el suero retenido en el interior de la cuajada.
- i. **Almacenado.** La refrigeración entre 4 °C y 6 °C, permite que el queso alcance su punto final de textura y presentación y evita el crecimiento microbiano, sin afectar las características sensoriales del producto (Fundación para la Innovación Agraria de Chile, 2007).

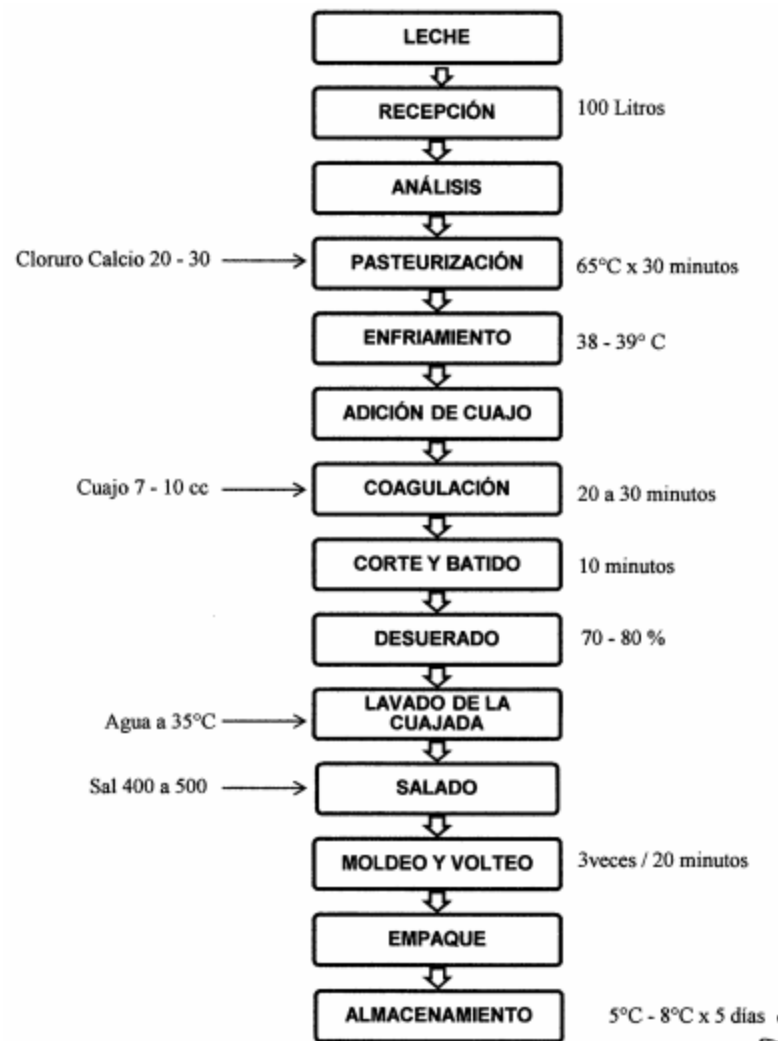


Figura 2. Diagrama de flujo del queso fresco. (FAO, 1992).



### 2.2.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Son microorganismos que poseen características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común, son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico producto de la fermentación de carbohidratos (Vázquez *et al.*, 2009), además, las BAL son ácido tolerantes logrando crecer a valores de pH de 3.2, otras a valores altos de 9.6, la mayoría crece a pH de 4 y 4.5, valores originados por los ácidos orgánicos que producen (Carr *et al.*, 2002).

Las BAL tienen amplia distribución en la naturaleza y fueron aisladas de alimentos, tierra, plantas verdes y del tracto digestivo y vagina de mamíferos (Azadnia *et al.*, 2011), para reproducirse requieren de glucosa y lactosa, aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento, siendo la leche el medio ideal para la proliferación de las BAL, aunque también lo son las masas de cereales, los vegetales y la carne (Vázquez *et al.*, 2009), son utilizados como iniciadores en la elaboración y conservación de productos lácteos, tales como leche acidificada, yogurt, mantequilla, crema, kefir y quesos y en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales (García *et al.*, 1998).

Las BAL se clasifican según su morfología, el modo fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina. Los géneros de BAL son: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Carr *et al.*, 2002), de todos ellos, los más representativos son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*.

Según el producto final de su fermentación, las BAL homofermentadoras entre ellas *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pedicococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico vía de glucólisis (Embden-Meyerhof)



(Axelsson, 1998). Mientras tanto los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunos *Lactobacillus* son heterofermentadoras y convierten hexosas a pentosas por la vía 6 – fosfogluconatofosfocetolasa, produciendo en el proceso además de ácido láctico, cantidades significantes de otros productos como acetato, etanol y CO<sub>2</sub> (Carr *et al.*, 2002), en la industria alimentaria las BAL heterolácticas son más importantes ya que producen compuestos que intensifican el sabor y aroma tales como acetaldehído y diacetilo (Jay, 2000).

### Caracterización funcional de las cepas

- a) **Actividad proteolítica – acidificante.** La determinación de la actividad proteolítica-acidificante se basa en la producción de ácidos, la coagulación y/o proteólisis de caseína por acción de las bacterias lácticas (Nikolic *et al.*, 2008).
- b) **Actividad lipolítica.** Consistió en sembrar la cepa correspondiente en agar nutritivo con 1 % de materia grasa añadida (aproximadamente 36 %), luego de incubar a 30 °C por 72 horas, vistas a contra luz se observa la presencia de un halo alrededor de la colonia, que indica degradación de grasa o lipólisis positiva (Morais, 2004).
- c) **Producción de gas.** Se realizó usando tubos de ensayo con 10 ml de caldo nutritivo suplementado con lactosa al 5%, se agregó un inóculo de 100 µl de cultivo de la cepa a la concentración del estándar 3 de MacFarland ( $9.0 \times 10^8$  UFC/ml), se mezcló perfectamente en un vórtex a continuación se colocó cuidadosamente la campana de Durham deslizándola por las paredes del tubo el cual tiene que llenarse del medio. Luego de 4 días a 30 °C, si la campana Durham se llenó de gas diera positivo (Ramírez & Vélez, 2016).

### Taxonomía de *Lactobacillus acidophilus*

Dominio: Bacteria

Clases: Bacilli

Orden: Lactobacillales

Familia: Lactobacillaceae

Género: *Lactobacillus*

Especie: *Lactobacillus acidophilus* (Moro 1900) Hansen & Mocquot 1970 (EBI, 2005).

### 2.2.3 Antagonismo bacteriano de las bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL producen componentes antimicrobianos que es el principio de su acción conservadora e inhibe a un gran número de microorganismos patógenos y dañinos, gracias a que producen sustancias como ácido láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas entre otros generados por la acción de la lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y tiocianato (Shirai *et al.*, 1996), las bacteriocinas son péptidos o proteínas biológicamente activas, con acción bactericida sobre receptores específicos de las células y son muy estudiadas por su actividad antimicrobiana sobre bacterias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella*, entre otras (Vázquez *et al.*, 2009).

La acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos disminuye el pH del ambiente inhibiendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, donde el ácido láctico penetra con facilidad la pared celular microbiana originando la disociación, liberando iones hidrógeno y el anión que interfieren en el metabolismo e inhiben el crecimiento celular (Vázquez *et al.*, 2009), en presencia de oxígeno las BAL producen peróxido de hidrógeno, que genera radicales hidroxilo y causan peroxidación a los lípidos de la membrana y susceptibilidad de la célula microbiana de muchos microorganismos (Ouweland, 1998).

El dióxido de carbono es un producto final de la fermentación heteroláctica y se obtiene mediante descarboxilación de aminoácidos por las BAL, originando un ambiente anaeróbico, reduce el pH y destruye la integridad de la pared celular microbiana (Ouweland, 1998), así mismo, el diacetilo es producido en el metabolismo intermediario del piruvato, y muestra actividad antimicrobiana a nivel de 200 µg/ml para levaduras y bacterias Gram negativas y a 300 µg/ml para bacterias Gram positivas no lácticas (Ouweland, 1998).

Las bacteriocinas de *Lactobacillus gasser* K7 que son adjuntadas en la elaboración de queso, inhibió el crecimiento de *Clostridium tyrobutyricum* y disminuyó la aparición de hinchazón (Bogovic *et al.*, 2007). *Lactobacillus reuteri* produce reuterina (3-hidroxi propionaldehído, 3-HPA), un antimicrobiano activo contra microorganismos Gram positivas y Gram negativas, levaduras y mohos (Stevens *et al.*, 2011), tales como



*Clostridium sporogenes*, *C. difficile* y *Clostridium clostridioforme* (Schaefer *et al.*, 2010). La producción y secreción de reuterina por *Lactobacillus reuteri* tiene relación con la capacidad de producir vitamina B12, donde están implicados los genes que poseen la estructura en los operones, *pdu* y *cbi-cob*, respectivamente, adyacentes en el cromosoma de *L. reuteri* (Morita *et al.*, 2008).

La reuterina como aditivo en leche, cuajada y queso Cottage, posee efecto inhibitorio en patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* o *Campilobacter jejuni* (Arqués *et al.*, 2004), pero su inconveniente sería que se pierde en el desuerado, pierde su actividad en la maduración y no está permitido legalmente Langa *et al.* (2013).

## 2.2.4 Bacterias patógenas

### a. *Escherichia coli*

Es utilizada como indicador de contaminación ya que se encuentran en los desechos fecales y su presencia es considerada no apta para consumo humano (Pascual & Anderson, 2000), fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quién la llamó *Bacterium coli*, luego se denominó *Escherichia coli*, en honor a su descubridor (Brock, 2006).

### Taxonomía de *Escherichia coli*

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clases	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacterales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Escherichia</i>
Especie	: <i>Escherichia coli</i> Escherich 1885 (EBI, 2005).

*Escherichia coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es Gram negativa, anaerobia facultativa, parte de la microbiota normal del intestino del hombre y los animales de sangre caliente, siendo la que más abunda entre las bacterias anaerobias facultativas





intestinales (Forbes *et al.*, 2004), es excretada diariamente entre  $10^8 - 10^9$  UFC/g de heces y, son indicadores de contaminación fecal reciente más utilizados (Pascual & Anderson, 2000), es una bacteria comensal no patógena, aunque existen diversas cepas que son capaces de producir enfermedad (Brock, 2006), producen vitaminas B y K, una tipificación incluye la determinación de los antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) y de fimbria (F) (Tortora *et al.*, 2007), son Gram negativas, anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su célula), no forma esporas, y fermentan la glucosa y la lactosa, entre las cepas patógenas se encuentran las enteroinvasivas (EIEC) que originan la disentería bacilar, asimismo se citan a *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatogénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* enteroadherente o enteroagregativa (Brock, 2006).

### **b. *Staphylococcus aureus***

Es un microorganismo ampliamente distribuido en el ambiente, coloniza al hombre y animales, siendo portador asintomático entre el 20 y 40% de los adultos sanos, forma parte de la flora normal como la piel y nasofaringe y el tracto gastrointestinal y causa muchas manifestaciones clínicas (Tortora *et al.*, 2007), a la coloración Gram son cocos Gram positivas de  $1 \mu\text{m}$  dispuestos en racimos, también en cadenas cortas o diplococos, es inmóvil y no forma esporas, es anaerobio facultativo y tiene un buen crecimiento en agar sangre a  $37^\circ\text{C}$  (Forbes *et al.*, 2004), son colonias  $\beta$  – hemolítica, de bordes definidos, blanca o dorada (Brock, 2006).

### **Taxonomía de *Staphylococcus aureus***

Dominio: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clases: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: *Staphylococcus*

Especie: *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 (EBI, 2005).

Son identificadas con las pruebas de la coagulasa, manitol y termonucleasa, donde son positivas, son susceptibles a algunos bacteriófagos específicos, y son reconocidos por su



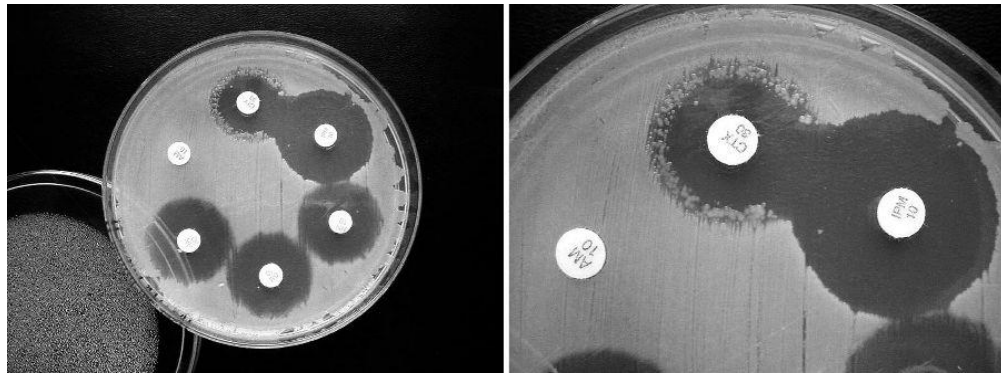
gran capacidad para producir productos extracelulares (Forbes *et al.*, 2004), es una de las bacterias más resistentes conocidos, pero pueden mantenerse viable por 6 – 14 semanas en secreciones purulentas (pus) y se necesitan 15 minutos de exposición al alcohol de 70° para su eliminación y la tintura de yodo es mucho más activa y requiere solo 1 minuto (Brock, 2006).

La adquisición de *Staphylococcus aureus* puede ser exógena o endógena, la exógena es a través de la contaminación de tejido traumatizado (heridas o quemaduras), material médico contaminado e ingestión de alimentos contaminados, es un agente de infección intrahospitalaria, resistente a la Oxacilina (Forbes *et al.*, 2004), la contaminación intrahospitalaria se lleva a cabo a través de las manos del personal, la infección endógena desde la piel, a través de fracturas, heridas o cuerpos extraños, en especial en pacientes inmunodeprimidos, con diabetes, malnutridos o que posee terapia de amplio espectro (Brock, 2006).

Los factores de virulencia de *S. aureus*, se basa en los productos extracelulares o propios de la célula bacteriana (Brock, 2006) entre ellos se tienen: la coagulasa, hemolisinas, la leucocidina, la hialuronidasa, la estafioquinasa, las lipasas, las enterotoxinas, la toxina exfoliativa, la proteína A, la penicilinasas o  $\beta$  – lactamasas, la catalasa, las exotoxinas pirogénicas y la toxina de shock tóxico (TSST – 1).

### **2.2.5 Antibiograma**

Es una prueba de diagnóstico microbiológico que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una determinada bacteria a un grupo de antibióticos o sustancias químicas de origen vegetal o animal, tal como se visualiza en la Figura 3 (Forbes *et al.*, 2004). Un antimicrobiano es una sustancia con capacidad potencial de matar o al menos de inhibir el crecimiento microbiano y sea aplicable en los pacientes, pueden ser naturales, sintéticos o semisintéticos (Pascual & Alexander, 2000), el uso de antibióticos incrementó la esperanza de vida de las personas que fallecían generalmente por los procesos infecciosos (Sánchez & Feris, 1998).



**Figura 3.** Pruebas de susceptibilidad bacteriana a un antibiótico o antibiograma (Sánchez & Feris, 1998).

El antibiograma posee cuatro aplicaciones principales: para instaurar un tratamiento antibiótico correcto al paciente, ya que se debe conocer si el microorganismo responsable de la infección posee mecanismos de resistencia a los antibióticos e incluirlo como terapia; realizar el seguimiento de la confirmación de tratamientos empíricos; para realizar técnicas de estudio de resistencia es la epidemiología; y tiene utilidad diagnóstica porque el perfil de resistencia puede en algún caso orientar en la identificación bacteriana (Sánchez & Feris, 1998).

### Inhibición bacteriana de antibióticos

**Tabla 5.** Gentamicina y diámetros críticos para *Escherichia coli* y *Staphylococcus* spp (INS, 2002).

Bacteria	Diámetro de halo (mm)		
	Resistente	Intermedio	Sensible
<i>Escherichia coli</i>	< 12	13 – 14	> 15
<i>Staphylococcus</i> spp	< 12	13 – 14	> 15

## CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 ZONA DE ESTUDIO

La investigación se realizó en la ciudad de Puno, los muestreos de los quesos frescos se realizaron en los mercados Unión y Dignidad (coordenadas  $15^{\circ}50'23.9''$  – S y  $70^{\circ}01'10.4''$  – O), Laykakota ( $15^{\circ}50'46.7''$  – S y  $70^{\circ}01'14.2''$  – O) y Central ( $15^{\circ}50'14.7''$  – S y  $70^{\circ}01'35.6''$  - O). Son los mercados más grandes y más abarrotados, donde no solo se expenden productos de primera necesidad, también ropas, comidas, materiales de aseo, calzados, entre otros, los siete días de la semana. El mercado Laykakota se caracteriza por tener solo una planta, posee pasadizos y cuatro puertas de ingreso, el cual está distribuido por secciones tales como comidas, carnes y pescados, juguerías, verduras, abarrotes, entre otros; el mercado Unión y Dignidad tiene una distribución similar y número de pisos; mientras tanto el mercado Central posee dos plantas y es en la segunda planta donde expenden viandas, ropas, telas y demás relacionados a la corte y confección.



**Figura 4.** Ubicación de los mercados en la ciudad de Puno, donde se muestrearon los quesos frescos, agosto – octubre 2017 (Googlemap, 2019).

### 3.2 TIPO DE ESTUDIO

Fue un estudio descriptivo, porque se buscó especificar las propiedades y características importantes de un fenómeno que se analice, aquí se determinó la carga de *Lactobacillus*

sp en quesos frescos. Fue explicativo, porque se pretendió establecer las causas de los sucesos o fenómenos que se estudian (Hernández *et al.*, 2014), donde se estableció a que se debe la presencia de *Lactobacillus* sp y cómo origina el efecto antagónico en bacterias patógenas. Fue experimental, ya que se experimentó *Lactobacillus* sobre *E. coli* y *Staphylococcus aureus* y determinar los cambios que originaría (Caballero, 2005), y fue de corte transversal, ya que se realizó, en un momento dado, durante los meses de agosto a octubre del año 2017.

### 3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

La muestra fue no probabilística por conveniencia (Casal & Mateu, 2003), en razón de que el número de quesos en los tres mercados de muestreo (Unión y Dignidad, Laykakota y Central) es no cuantificable o infinita, y debido a que el número de expendedores de quesos es variable, inclusive durante los días de la semana, el número de muestras representativas estuvo distribuido según la Tabla 6. En cada mercado se llevó acabo tres muestreos mensuales, haciendo un total de 27 unidades experimentales, la toma de muestra se realizó principalmente los días sábados (mercado Unión y Dignidad), días lunes (mercados Laykakota y Central).

**Tabla 6.** Distribución de muestras por mercado y meses de muestreo, realizado durante los meses de agosto a octubre del año 2017.

Meses de muestreo	Zonas de muestreo (mercados)			Total
	Unión y Dignidad	Laykakota	Central	
Agosto	3	3	3	9
Setiembre	3	3	3	9
Octubre	3	3	3	9
Total	9	9	9	27

### 3.4 EVALUACIÓN DE LA CARGA DE BACTERIAS *Lactobacillus* SP EN QUESOS FRESCOS

#### a. Frecuencia de muestreo

Las muestras de queso fueron colectadas en bolsas de plástico Ciflot con cierre hermético, y transportadas en una caja de tecnopor acondicionada, que contenía bolsas de hielo para mantener la temperatura de refrigeración a 4 °C, con dirección hacia el laboratorio de



Microbiología de la Escuela Profesional de Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, UNA – Puno. Los muestreos se llevaron a cabo en forma mensual, en cada mes se trabajaron tres muestras, llegando al total de las 27 muestras.

## **b. Descripción detallada del uso de materiales, equipos, instrumentos e insumos**

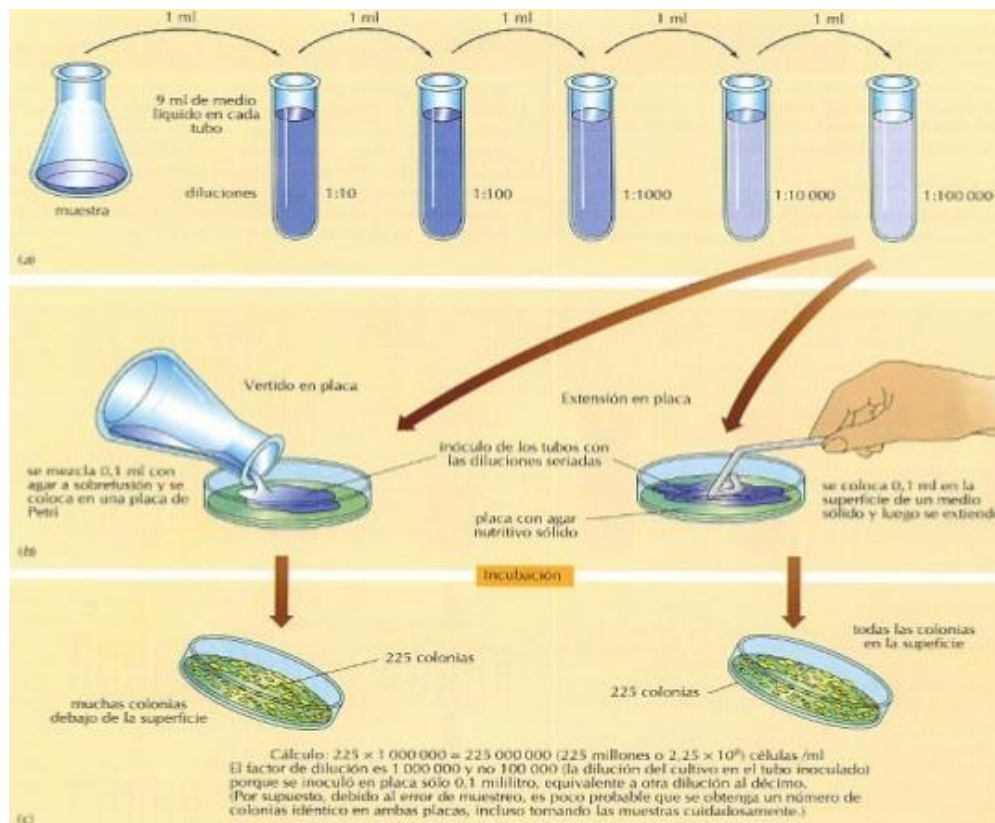
### **Recuento de *Lactobacillus* sp en quesos frescos**

**Método.** Recuento en placa.

**Fundamento.** La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un g o ml de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo (Camacho *et al.*, 2009).

**Procedimientos.** Se tomaron 10 g de queso fresco, ésta se llevó a 90 ml de agua destilada y se procedió a realizar diluciones seriadas, desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ . A continuación, se realizaron siembras en superficie en agar *Lactobacillus* (proteosa peptona 10.0 g/l; extracto de carne 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; dextrosa 20 g/l, polisorbato 80 1.9 g/l; citrato de amonio 2 g/l; acetato de sodio 5 g/l; sulfato de magnesio 0.1 g/l, sulfato de manganeso 0.1 g/l; fosfato de potasio bibásico; y agar agar), transfiriendo a cada dilución 0.1 ml a cada una de las placas según dilución, para luego difundirlo sobre la superficie con un asa de Digrafsky (Figura 5).

Posteriormente las placas cultivadas fueron incubarán por 48 horas a 37 °C en condiciones de microaerofilia (10% CO<sub>2</sub>). Seguidamente se realizó una identificación morfológica por tinciones de Gram, los lactobacilos aparecieron como medianas a grandes colonias blancas. Para la determinación de la carga de *Lactobacillus* en los quesos, se contaron las colonias y éste se multiplicó por el factor de dilución de la muestra, y así se obtuvieron las UFC/g por muestra. El crecimiento se diferenció aún más mediante pruebas microscópicas y bioquímicas.



**Figura 5.** Procedimientos a realizar para la cuantificación de *Lactobacillus* sp (Madigan et al., 2014).

**Identificación bacteriana según pruebas bioquímicas.** La identificación bioquímica de los tipos de las cepas del género *Lactobacillus* sp, se realizó por medio de pruebas de azúcares fermentables (lactosa) por medio de la técnica de microplaca, para esto se procedió a la preparación de 10 ml de cada uno de los azúcares al 1%, 10 ml de rojo fenol al 0.1%, se formuló 4 soluciones de las colonias aisladas presuntivas de *Lactobacillus* sp en solución salina al 0.85% (p/v) hasta alcanzar una concentración igual al tubo de  $1.5 \times 10^8$  células/ml, la asimilación o fermentación de los azúcares se evidenció por un viraje de color del indicador rojo de fenol, a continuación, se realizó pruebas de catalasa y de tolerancia a NaCl, mediante el método ecométrico sembrando cepas de *Lactobacillus* sp en agar *Lactobacillus* suplementado con tres concentraciones de NaCl (3.5, 4.5 y 5.5% p/v) y se compararon contra un control positivo sembrando las cepas en medio de agar *Lactobacillus* sin NaCl, todas las pruebas se realizaron por triplicado.



### c. Variables analizadas

- **Variable independiente:** Quesos adquiridos en mercados de la ciudad.
- **Variable dependiente:** Recuento de *Lactobacillus* en UFC/g.

### d. Aplicación de prueba estadística inferencial

El diseño fue del completo al azar y tuvo tres tratamientos (mercados Unión y Dignidad, Laykakota y Central), cada experimento tuvo 3 repeticiones, que fueron distribuidos durante los meses de agosto, setiembre y octubre. Previamente se evaluó si los datos obtenidos de los recuentos bacterianos cumplen con los supuestos para análisis de varianza, luego se calcularon las pruebas estadísticas descriptivas como promedio, desviación estándar y coeficiente de variabilidad, si en caso no cumpliera se realizó la prueba de Kruskal Wallis y para determinar si tiene diferencia estadística significativa se realizó la prueba Tukey. Para todo el análisis se consideró un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$  (Ibáñez, 2009). Los análisis de datos y la generación de gráficos se realizaron en los softwares Excel e Infostat 2008 versión estudiantil. El modelo aditivo lineal del diseño de bloque completo al azar fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

**Donde:**  $Y_{ij}$  es la variable respuesta (halo de inhibición del efecto antagónico);  $\mu$  es la media general;  $\tau_i$ , el efecto del  $i$  – ésimo tratamiento (mercados de la ciudad de Puno),  $\beta_j$  meses de evaluación y  $\varepsilon_{ij}$  será el efecto del error experimental.

## 3.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE *Lactobacillus* SP SOBRE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

### a. Frecuencia de muestreo

Las pruebas antagónicas de la concentración bacteriana de *Lactobacillus* sp sobre las bacterias *E. coli* y *S. aureus* se realizó cada 15 días.





## **b. Descripción detallada del uso de materiales, equipos, instrumentos e insumos**

### **Aislamiento de cepas de *Staphylococcus aureus***

**Método.** Aislamiento de cultivo puro por técnica de estría cruzada en placa.

**Fundamento.** Los cultivos puros están formados por un solo tipo de microorganismo; y son indispensables para conocer las características morfológicas, propiedades de tinción, actividad bioquímica, patogenicidad, sensibilidad a antibióticos e identificación de las especies microbianas.

**Procedimiento.** *St. aureus* fue aislado a partir de la superficie de los quesos expendidos en los mercados, a partir del cual, con ayuda de un hisopo estéril, se realizó los hisopados de la superficie corporal, seguidamente la muestra colectada fue cultivada en placas de agar Manitol Salado, para evitar el desarrollo de flora acompañante y obtener un mejor aislamiento de las colonias, y fueron incubados a 37 °C durante 24 horas. Se consideraron positivos a *S. aureus*, aquellas colonias hicieron virar de rojo a amarillo el medio de cultivo, adicionalmente se observó las características culturales, la coloración de Gram, el metabolismo del manitol y la prueba de la catalasa (Quisberth, 2007).

### **Aislamiento de cepas de *Escherichia coli***

**Método.** Cuenta de microorganismos viables por dilución en placa

**Fundamento.** La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un g o ml de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo (Camacho *et al.*, 2009).

**Procedimiento.** Luego de obtener las diluciones de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , a partir de las muestras de queso, un ml de cada dilución fue transferido a una placa Petri, a continuación, se transfirió 20 ml de Agar EMB, seguidamente se realizaron movimientos



suaves para una uniforme distribución de la muestra y posterior crecimiento de bacterias. Las placas Petri fueron llevadas a incubación por 24 horas a 37 °C, la identificación de *E. coli* en el medio EMB, fue mediante la coloración que posean las colonias y fueron consideradas como *E. coli* aquellas de color púrpura con centro negro y brillo metálico verde, asimismo se realizó la coloración Gram.

### **Evaluación del efecto antagónico de bacterias *Lactobacillus* sp sobre cepas patógenas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.**

Para cumplir este objetivo se tomaron en consideración los procedimientos realizados por Ramírez (2010).

**Método.** Kirby Bauer.

**Fundamento.** En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Se incuban por 24 - 48 horas a 37 °C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (Rojas, 2011).

**Procedimiento.** Se formularon suspensiones de *Lactobacillus* sp de  $1.5 \times 10^8$  células/ml, las concentraciones bacterianas fueron obtenidas mediante la técnica de McFarland, e impregnadas en discos de papel filtro estéril. Previamente con un hisopo estéril, se realizó la siembra de *S. aureus* y *E. coli* en agar Muller Hinton, luego se procedió a colocar los discos impregnados con la concentración de *Lactobacillus* sp y el tratamiento control (discos de gentamicina 10 µg), sobre el agar previamente inoculado, las placas Petri fueron incubadas a 37 °C durante 48 horas, finalmente se midieron los halos de inhibición bacteriana originado por *Lactobacillus* en el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, que fueron comparados con los valores referenciales del INS (2002) y se determinó si fueron resistentes, intermedios o sensibles a los tratamientos, el porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula matemática (Corso, 2012):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\Phi \text{ halo } Lactobacillus - \Phi \text{ halo blanco})}{(\Phi \text{ halo } Gentamicina - \Phi \text{ halo blanco})} \times 100$$

**c. Variables analizadas**

- **Variable independiente:** *Lactobacillus* sp
- **Variable dependiente:** halo y porcentaje de inhibición bacteriana.

**d. Aplicación de prueba estadística inferencial**

El diseño experimental fue del bloque completo al azar y consistió de tres tratamientos (control positivo – gentamicina 10 µg; concentración de bacterias *Lactobacillus* sp; y control negativo – agua destilada), cada experimento tuvo un total de 3 repeticiones, los cuales estuvieron distribuidos durante tres meses de ejecución, las unidades experimentales estuvieron constituidas por 27 muestras, los halos de inhibición fueron previamente evaluados si cumplen con los supuestos para análisis de varianza, luego se calcularon las pruebas estadísticas descriptivas como promedio, desviación estándar y coeficiente de variabilidad, si en caso no cumpliera se realizó la prueba de Kruskal Wallis y para determinar si tiene diferencia estadística significativa se realizó la prueba Tukey. Para todo el análisis se consideró un nivel de significancia de alfa = 0.05 (Ibáñez, 2009). Los análisis de datos y la generación de gráficos se realizaron en los softwares Excel e Infostat 2008 versión estudiantil.

El modelo aditivo lineal del diseño de bloque completo al azar fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

**Donde:**  $Y_{ij}$  es la variable respuesta (halo de inhibición del efecto antagónico);  $\mu$  es la media general;  $\tau_i$ , el efecto del  $i$  – ésimo tratamiento (mercados de la ciudad de Puno);  $\beta_j$  es el efecto de bloque (meses de evaluación) y  $\varepsilon_{ij}$  será el efecto del error experimental.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CARGA DE BACTERIAS *Lactobacillus* SP EN QUESOS FRESCOS

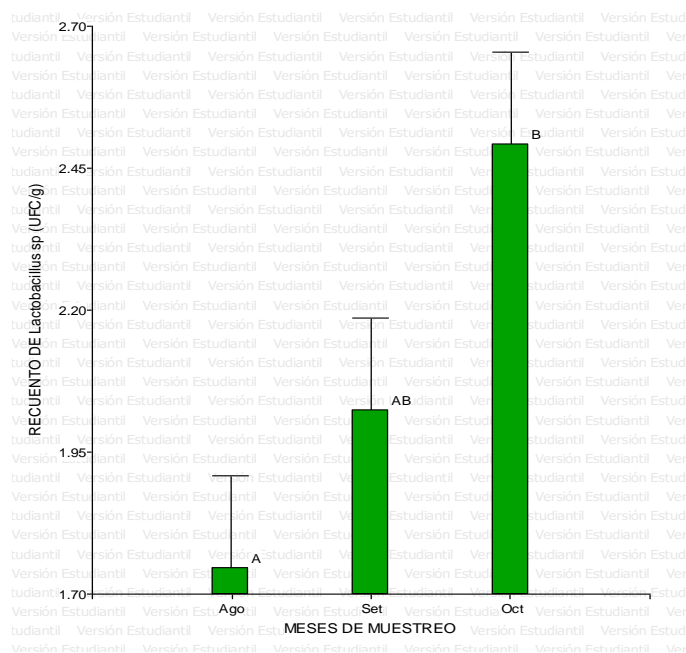
Los recuentos de *Lactobacillus* sp en quesos frescos expendidos en tres mercados de la ciudad de Puno, oscilaron con promedios de  $1.57 \times 10^5$  UFC/g y  $2.97 \times 10^5$  UFC/g. En el mercado Unión y Dignidad los recuentos de *Lactobacillus* sp, los promedios variaron entre  $1.83 \times 10^5$  UFC/g y  $2.97 \times 10^5$  UFC/g, los quesos procedentes del mercado Laykakota entre  $1.57 \times 10^5$  UFC/g y  $2.03 \times 10^5$  UFC/g y en el mercado Central entre  $1.83 \times 10^5$  UFC/g y  $2.47 \times 10^5$  UFC/g (Tabla 7). Como se observa también, se visualiza como una tendencia al incremento de los recuentos de *Lactobacillus* sp, en el transcurrir de los meses de evaluación. Por otro lado, los coeficientes de variabilidad indican que los resultados hallados durante los meses, presentaron dispersión y coeficientes de variabilidad entre leve y moderada, por lo que fue aplicable la realización de pruebas paramétricas, posteriormente.

**Tabla 7.** Recuento de bacterias *Lactobacillus* sp ( $\times 10^5$  UFC/g) en quesos frescos de los mercados de Puno, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.

Mercados	Meses de muestreo	Repeticiones			Prom	D. E.	C. V. (%)
		1	2	3			
Unión y Dignidad	Agosto	1.9	2.1	1.5	1.83	0.31	16.66
	Setiembre	2.5	2.3	2.5	2.43	0.12	4.75
	Octubre	3.4	2.7	2.8	2.97	0.38	12.76
Laykakota	Agosto	1.6	1.8	1.3	1.57	0.25	16.06
	Setiembre	1.2	2.2	1.4	1.60	0.53	33.07
	Octubre	1.8	1.9	2.4	2.03	0.32	15.81
Central	Agosto	2.4	1.9	1.2	1.83	0.60	32.88
	Setiembre	2.8	1.7	1.6	2.03	0.67	32.75
	Octubre	2.7	2.5	2.2	2.47	0.25	10.20

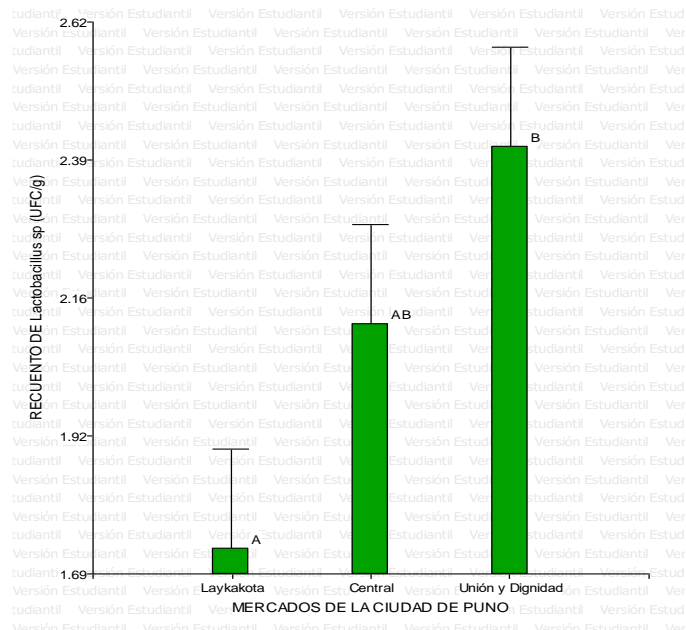
En cuanto a los recuentos de *Lactobacillus* sp, no se logró encontrar valores referenciales de su contenido en quesos frescos, la única referencia encontrada que se asemeja a los

valores normales sería los resultados de Davés *et al.* (2001), quien al encontrar cifras de  $1.8 \times 10^6$  UFC/g, las mencionó como valores elevados, por tanto, se afirma que los recuentos bacterianos obtenidos se encuentran en el rango apropiado para el consumo humano. Asimismo, se observó los expendedores de quesos frescos lo venden generalmente en los pasillos y alrededores de los mercados de donde se colectaron las muestras, en razón de que horas antes de que fueran comercializados ordeñan los vacunos y realizan los procesos para la obtención del queso, por eso muchas veces luego de haberlos comprado y puestos en bolsas plásticas, estas liberaron el suero lácteo.



**Figura 6.** Prueba de Tukey a los recuentos de *Lactobacillus* sp según meses de muestreo, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.

El análisis de varianza realizado a los recuentos de *Lactobacillus* sp en muestras de quesos, presentó diferencia estadística significativa entre meses ( $F=5.43$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0113$ ) (Tabla 9 – Anexos) y según la prueba de Tukey, los menores recuentos se obtuvieron en el mes de agosto, incrementándose en el transcurrir de los meses, siendo mayor en el mes de octubre (Figura 6). El incremento paulatino en el pasar de los meses de evaluación, se debió probablemente a que las temperaturas ambientales tienden a incrementarse, en la región Puno, estaríamos en el cambio de estación de invierno a primavera. Por otro lado, también según la observación y colecta *in situ* de los quesos frescos, se tuvo la casualidad de haber adquirido quesos recientemente producidos o muy frescos y en el mes de agosto todavía el clima es más seco, los quesos tienen a secarse en el ambiente y dejan de producir suero lácteo, disminuyendo la presencia de *Lactobacillus* sp.



**Figura 7.** Prueba de Tukey a los recuentos de *Lactobacillus* sp según mercados de muestreo, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.

El análisis de varianza realizado a los recuentos de *Lactobacillus* sp en muestras de quesos, presentó diferencia estadística significativa entre mercados ( $F=4.09$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0297$ ) (Tabla 10 – Anexos) y según la prueba de Tukey, los menores recuentos se obtuvieron en el mercado Laykakota y los mayores en el mercado Unión y Dignidad (Figura 7). El mayor recuento de bacterias *Lactobacillus* sp, se determinó en el mercado Unión y Dignidad, esto se debería probablemente a que los comerciantes de quesos llevan sus productos primeramente a dicho mercado, en razón a que posee la mayor afluencia de amas de casa y los precios son menores, muchas veces son comprados por personas que revenden los mismos quesos en el mismo mercado o los llevan a otros y el queso tiende a secarse, disminuyendo así la carga bacteriana de *Lactobacillus* sp.

Los resultados obtenidos de recuentos de *Lactobacillus* sp en la investigación llegaron a  $2.97 \times 10^5$  UFC/g de queso, estos resultados fueron inferiores a los reportados por Guerrero *et al.* (2017) quienes encontraron en quesos de producción industrial, recuentos de  $3.88 \times 10^8$  UFC/g, Peralta (2014), quien registró valores de  $4.5 \times 10^7$  UFC/g y  $4 \times 10^8$  UFC/g de queso, luego de 14 días de maduración en la producción industrial; Obando *et al.* (2010), quienes en queso Cottage determinaron que *Lactobacillus acidophilus* y *L. casei* registraron recuentos de  $1 \times 10^6$  UFC/g a los 21 días de maduración; Buriti *et al.* (2007), quienes queso Minas frescal probiótico, *L. acidophilus* tuvo recuentos de  $10^8$



UFC/g, decreciendo a los 14 días; pero fueron similares a los obtenidos por Tapia (2014), quien realizó recuentos de bacterias probióticas en queso tipo Paria, encontrando *Lactobacillus acidophilus* con recuentos de  $39 \times 10^5$  UFC/g al día 28 de maduración; Batista (2006), en queso fresco típico en Brasil, Minas frescal, observó poblaciones promedio de *Lactobacillus acidophilus* mayores a  $10^6$  UFC/g; y Cristóbal & Maurtua (2003), quien evaluar la calidad bacteriológica de quesos frescos artesanales cuantificaron un promedio de  $1.6 \times 10^5$  UFC/g de *Lactobacillus* spp.

Las bacterias ácido lácticas entre ellas las bacterias *Lactobacillus* sp, poseen limitadas habilidades biosintéticas (Klaenhammer *et al.*, 2005) y altos requerimientos de fuentes de energía tales como carbono y nitrógeno (Salminen & Von Wright, 1998) por lo que los quesos al poseer altos contenidos de proteínas de la leche (Vélez, 2009), se constituye en un hábitat natural entre los productos fermentados, pero las bacterias *Lactobacillus* sp y otras bacterias ácido lácticas, contribuyen inmensamente al flavor, textura, valor nutricional y seguridad microbiana de dichos alimentos, en tal sentido posee aplicación industrial y que al reducir los valores de la acidez del queso, disminuye la carga bacteriana de *Escherichia. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp, *Lactobacillus* sp y *Streptococcus* sp, por lo tanto, garantizaría la producción de quesos inócuos (González & Franco, 2015).

Es posible aislar bacterias del género *Lactobacillus* sp, tal como lo confirma Viloche & Tito (2007), quienes aislaron bacterias de *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus* y *L. casei* a partir de productos de fermentación como son queso, yogurt y leche, éstas bacterias contribuyen al sabor y a la conservación del queso (Soomro *et al.*, 2002). La presencia de *Lactobacillus* sp encontrados en los quesos frescos, se debería a que poseían alta concentración de humedad mayor al 46% (INDECOPI, 2004), debido a que fueron procesados recientemente.

Las bacterias *Lactobacillus* sp presentes en el queso fresco, procederían de la flora bacteriana de la leche cruda que posee en la ubre y la piel de la vaca, también se encuentran presentes en los utensilios, suelos o en las tuberías de ordeño, entre otros, donde predominan las Gram negativas, asimismo sobreviven las levaduras, mohos y bacterias ácido lácticas (Jay, 2000). Muchas especies de *Lactobacillus* sp son los únicos microorganismos que no requieren hierro para sobrevivir, asimismo posee una tolerancia



extremadamente alta al peróxido de hidrógeno, son microorganismos microaerófilos, anaerobios o anaerobios facultativos, su crecimiento es óptimo a pH de entre 5.5 y 5.8, y que cuando se eleva tiene a disminuir su población, resistiendo mejor la acidez que otras bacterias ácido lácticas y poseen requerimientos nutricionales estrictos para aminoácidos, péptidos, nucleótidos, vitaminas, especialmente B, minerales, ácidos grasos y carbohidratos (Mejía, 2001), razones por la cual el queso se constituye en un hábitat ideal para su multiplicación.

La presencia de *Lactobacillus* sp en el queso, no es perjudicial no solo porque crea ambientes adversos para que otros microorganismos no se establezcan, sino también ya que colabora con el cuerpo en razón de que produce vitamina K, lactasa y sustancias antimicrobianas como acidolina, acidolfina, lactocidina y lactacina, durante la digestión acrecienta la biodisponibilidad de niacina, ácido fólico, vitamina B6 (piridoxina), B12, biotina, ácidos grasos y calcio, asimismo, ayuda en la desconjugación y separación de aminoácidos por los ácidos biliares que consecutivamente pueden ser reciclados por el cuerpo (Prater, 2009). La especie *Lactobacillus acidophilus*, el nombre específico indica con afinidad por los ácidos, y crece inclusive a pH 4.5 o menores hasta 3.5, creciendo en condiciones óptimas de 37 °C, tolerando máximo entre 43 – 48 °C, y que a pesar de que Zamudio & Zavaleta (2003), manifiesta que por debajo de los 20 °C no registra crecimiento alguno, sería una de las razones de que la carga bacteriana de *Lactobacillus* sp fue menor a la de otros autores.

De todo lo analizado, se acepta la hipótesis nula, en razón de que la carga de bacterias *Lactobacillus* sp en quesos frescos expendidos en los mercados Unión y Dignidad, Central y Laykakota de la ciudad de Puno, fueron próximos a  $1.6 \times 10^5$  UFC/g, en razón de que se contabilizaron recuentos que llegaron a promedio de  $2.97 \times 10^5$  UFC/g.



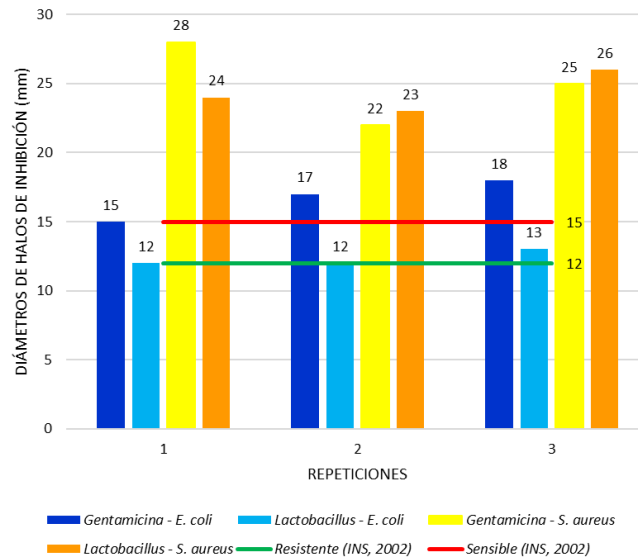
#### 4.2 EFECTO ANTAGÓNICO DE *Lactobacillus* Sp Aisladas, Sobre Cepas De *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

*Escherichia coli* resultó ser sensible a la gentamicina, en razón de que en el antibiograma se obtuvo un promedio de halo de inhibición de 16.67 mm, con una variación entre 15 y 18 mm; frente a los discos de sensibilidad de *Lactobacillus* sp, la bacteria *E. coli* resultó con un halo de inhibición promedio de 12.33 mm, con dicho experimento se obtuvo un porcentaje de inhibición del 73.96% de *Lactobacillus* sp sobre *E. coli*. *Staphylococcus aureus* también resultó ser sensible a la gentamicina, en razón de que en el antibiograma se obtuvo un promedio de halo de inhibición de 25 mm, con una variación entre 22 y 28 mm; frente a los discos de sensibilidad de *Lactobacillus* sp, la bacteria *S. aureus* resultó con un halo de inhibición promedio de 24.33 mm, con dicho experimento se obtuvo un porcentaje de inhibición del 97.32% de *Lactobacillus* sp sobre *S. aureus* (Tabla 8).

**Tabla 8.** Diámetros de halo de inhibición y porcentaje de inhibición de bacterias *Lactobacillus* sp en cepas patógenas, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.

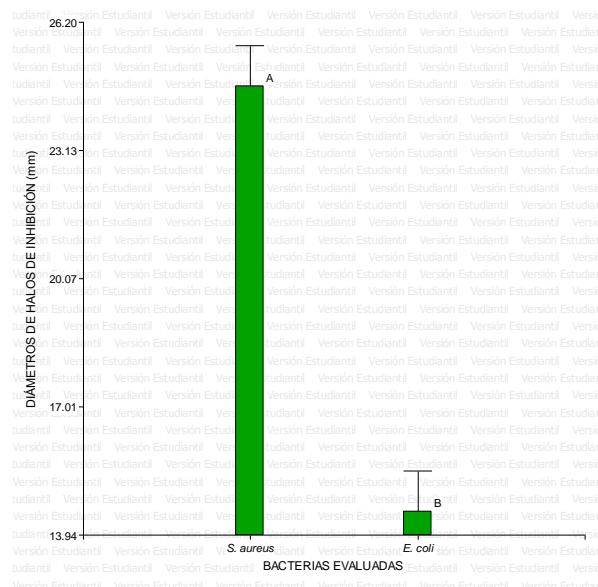
Mercados	Meses de muestreo	Repeticiones			Prom	DE	% inhibición
		1	2	3			
<i>Escherichia coli</i>	Gentamicina	15.0	17.0	18.0	16.67	1.53	73.96
	<i>Lactobacillus</i> sp	12.0	12.0	13.0	12.33	0.58	
	Control	0.0	0.0	0.0	0.00	0.00	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gentamicina	28.0	22.0	25.0	25.00	3.00	97.32
	<i>Lactobacillus</i> sp	24.0	23.0	26.0	24.33	1.53	
	Control	0.0	0.0	0.0	0.00	0.00	

Comparando con los valores referenciales del INS (2002), *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* resultaron sensibles a la gentamicina, en razón de que los halos de inhibición bacteriana fueron mayores a los 15 cm. Si contrastamos frente a *Lactobacillus* sp, se afirma que *E. coli* tuvo una respuesta intermedia (13 – 14 mm), mientras tanto *S. aureus* resultó ser sensible a *Lactobacillus* sp (> 15 mm) (Figura 8).



**Figura 8.** Diámetros de halos de inhibición bacteriana con gentamicina y *Lactobacillus* sp, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.

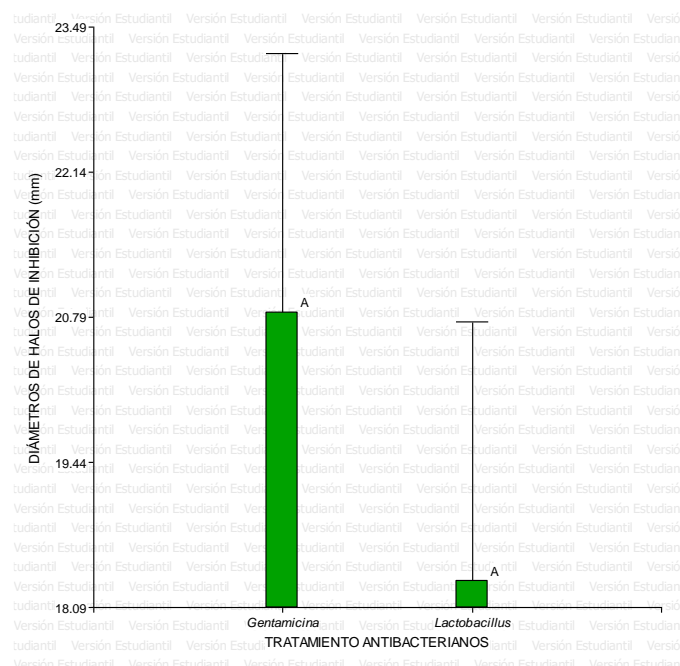
El análisis de varianza realizado a los diámetros de halos de inhibición en el antibiograma, presentó diferencia estadística significativa entre las bacterias ( $F=54.56$ ;  $gl=1$ ;  $P<0.0001$ ) (Tabla 11 – Anexos) y según la prueba de Tukey, los menores diámetros de halos de inhibición bacteriana se presentaron en *E. coli* y los mayores halos de inhibición *S. aureus* (Figura 9).



**Figura 9.** Prueba de Tukey a los recuentos de *Lactobacillus* sp según mercados de muestreo, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.

El análisis de varianza realizado a los diámetros de halos de inhibición en el antibiograma, no presentaron diferencia estadística significativa entre los tratamientos ( $F=0.54$ ;  $gl=1$ ;

P=4799) (Tabla 12 – Anexos); pero, según la prueba de Tukey, los menores diámetros de halos de inhibición bacteriana se obtuvieron con el antibiótico gentamicina (Figura 10). En la investigación se logró una inhibición del 97.32% de *Lactobacillus* sp sobre *S. aureus* y del 73.96% sobre *E. coli*, lo cual concuerda con lo reportado por Jurado & Gúzman (2015), quienes determinaron el efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* sobre *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, aisladas de una leche con mastitis subclínica; Peralta (2014), evaluó que las bacterias ácido lácticas aisladas de queso fresco artesanal poseen actividad antagónica frente a *Listeria monocytogenes* y *E. coli*; Vallejo *et al.* (2009), demostraron que *Lactobacillus* sp aisladas de queso ovino inhibió a *Escherichia coli* O157:H7; Cástulo *et al.* (2008), aislaron bacterias ácido lácticas, a partir de quesos frescos, y lograron inhibir a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*; Ramírez (2005), quien aisló cepas de bacterias ácido lácticas desde quesos y el 24.57% mostraron actividad antibacteriana contra al menos uno de los microorganismos patógenos, entre ellos *Listeria monocytogenes*.



**Figura 10.** Prueba de Tukey a los recuentos de *Lactobacillus* sp según mercados de muestreo, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.

En contraste, muchas bacterias resultaron ser resistentes a las bacterias ácido lácticas, así lo reporta Gúzman (2015), quien determinó que *E. coli* fue resistente a la cepa láctica *Lactobacillus casei*; Cástulo *et al.* (2008), quienes demostraron que las bacterias ácido



lácticas, no inhibieron a *Salmonella agona*. La falta de inhibición bacteriana de las bacterias ácido lácticas se debería probablemente a que dichas bacterias patógenas o indicadoras de contaminación poseerían mecanismos de defensa innatos o adquiridos mediante conjugación bacteriana, así como a que los Gram negativos presentan una capa de lipopolisacáridos en su membrana externa la cual actúa como barrera de permeabilidad celular, que inhibe el ingreso de moléculas hacia el interior de la membrana citoplasmática (Schelegueda *et al.*, 2015).

Sin embargo, al contrario, las bacterias lácticas originan un ambiente a pH ácido, sintetiza ácidos orgánicos y enzimas proteolíticas que altera la fisiología bacteriana, así lo corrobora Vallejo *et al.* (2009), quienes demostraron que *Lactobacillus* sp produce ácidos orgánicos entre ellos el ácido láctico, por lo que actualmente se habla de la biopreservación mediante bacterias ácido lácticas. A parte de los ácidos orgánicos, las bacterias ácido lácticas producen peróxido de hidrógeno, bacteriocinas como es el caso de *Lactococcus lactis*, que inhiben el crecimiento de bacterias zoonóticas y originan toxiinfecciones alimentarias en las personas (Soomro *et al.*, 2002), asimismo producen aparte de los metabolitos mencionados, el ácido acético, diacetilo y tiocianato (Shirai *et al.*, 1996), las bacteriocinas son proteínas biológicamente activas, que tienen acción bactericida en receptores específicos de las células bacterianas, dañando la fisiología de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* sp, entre otras bacterias (Vázquez *et al.*, 2009).

Las bacterias ácido lácticas, al biosintetizar y acumular ácido láctico y otros ácidos orgánicos, reducen el pH del hábitat inhibiendo así bacterias Gram – positivas y Gram – negativas, asimismo el ácido láctico disociado penetra con facilidad la pared celular y altera su pH, liberándose iones hidrógeno y el anión correspondiente, los cuales interfieren el metabolismo inhibiendo así su crecimiento celular (Vázquez *et al.*, 2009), en ambientes aeróbicos las bacterias ácido lácticas, producen peróxido de hidrógeno, el cual libera radicales hidroxilo, éstos originan la peroxidación a los lípidos de la membrana alterando su fisiología (Ouwehand, 1998).

Las bacterias ácido lácticas en condiciones anaeróbicas, conlleva a que el dióxido de carbono en la fermentación heteroláctica y reduce el pH, coadyuvando a la destrucción de la integridad de la pared celular microbiana (Ouwehand, 1998). Entre las bacteriocinas



previamente mencionadas, se cita a la nisina, producida por *Lactococcus lactis*, reconocida como segura por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (Ronk 1988), siendo efectivas en la destrucción de esporas de *Clostridium* spp (Delves *et al.*, 1996), originando poros en la membrana de las esporas impidiendo el aumento de tamaño en la fase de la germinación, por lo que es muy recomendada en la industria láctea (Somers & Taylor 1987).

Muchas bacteriocinas son producidas por diversas especies de *Lactobacillus* sp, entre ellas se cita a *Lactobacillus gasseri* K7 que es utilizado en la elaboración de queso, y reduce el crecimiento de *Clostridium tyrobutyricum* y la aparición de hinchazón (Bogovic *et al.*, 2007), por otro lado, *Lactobacillus plantarum* TF711, produce plantaricina TF711, quien previene la hinchazón originada por *Clostridium sporogenes*, en la elaboración de queso (González & Zárate 2015); asimismo, cepas de *Lactobacillus reuteri* producen reuterina (3- hidroxipropionaldehído, 3-HPA), que es un compuesto antimicrobiano muy activo a microorganismo patógenos incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras y mohos (Stevens *et al.*, 2011).

Por lo tanto, las bacteriocinas se constituyen en una alternativa a uso masivo de antibióticos, ya que la resistencia bacteriana disminuye frente a ellas, y combaten grupos bacterianos patógenos con resistencia a los antibióticos (Savadojo *et al.*, 2006). Fue interesante tener en cuenta a las bacterias ácido lácticas en su desempeño frente a las infecciones que podrían originar *E. coli* y *S. aureus*. El uso desmedido de antibióticos y el incremento de resistencia antimicrobiana en bacterias, el incremento de pacientes inmunodeprimidos y de presencia de infecciones oportunistas en muchos pacientes, y el origen de enfermedades emergentes, son acontecimientos que determinan la necesidad de descubrir nuevas estrategias para el tratamiento y prevención de las infecciones microbianas (Larrea *et al.*, 2007).

De todo lo analizado, se acepta la hipótesis planteada, en razón de que *Lactobacillus* sp aislados desde quesos frescos expendidos en los mercados Unión y Dignidad, Central y Laykakota de la ciudad de Puno, presentaron un efecto antagónico sobre *E. coli* y *S. aureus*, con porcentajes de inhibición de 73.96 % y 97.32 % respectivamente.



## V. CONCLUSIONES

- La carga de bacterias *Lactobacillus* sp en quesos frescos expendidos en los mercados Unión y Dignidad, Central y Laykakota de la ciudad de Puno, presentaron promedios de  $1.57 \times 10^5$  UFC/g y  $2.97 \times 10^5$  UFC/g, siendo mayor en el mercado Unión y Dignidad y menor en el mercado Laykakota y en cuanto a los meses fue mayor en el mes de octubre y menor en el mes de agosto, dichos valores manifiestan que los quesos se encuentran en condiciones inocuas según el número de *Lactobacillus* sp contabilizados.
- *Lactobacillus* sp aislados de queso fresco expendidos en los mercados de la ciudad de Puno, presentaron efecto antagónico sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, originando halos de inhibición promedio de 12.33 mm (respuesta intermedia) y 24.33 mm (respuesta sensible) e inhibiciones de 73.96 y 97.32%, respectivamente.



## VI. RECOMENDACIONES

- A los egresados de la Facultad de Ciencias Biológicas, que realicen investigaciones en la identificación bioquímica de especies de bacterias ácido lácticas, en razón de que en el queso es posible encontrar bacterias que no tienen función relevante en términos de conferir atributos de protección, generación de aromas y sabor o modificación de textura.
- A la Dirección General de Salud Ambiental del MINSA, realizar estudios fisicoquímicos de pH y acidez titulable del queso, en razón de que coadyuvarían a una mejor interpretación de los recuentos bacterianos y así determinar la calidad fisicoquímica de los quesos.
- A los investigadores en Calidad de Alimentos, realizar estudios de sensibilidad a bacterias ácido lácticas en bacterias Gram positivas y Gram negativas resistentes a antibióticos.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alais, C. (1985). Ciencia de la leche. 1ra Edición. Editorial Reverte. Barcelona, España.
- Anastasiou, R., Aktypis A., Georgalaki M., Papadelli M., De Vuyst L. & Tsakalidou E. (2009). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 under conditions mimicking Kasserli cheese production and ripening. *International Dairy Journal*. Vol. 19: 330 – 335.
- Arqués, L., Fernández J., Gaya P., Núñez M., Rodríguez E. & Medina M. (2004). Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 95: 225 – 229.
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. En: *Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects*. (Salminen, S. y Wright, A. von, eds.), 2nd edition. Pp. 1-72. Marcel Dekker Inc. New York, USA
- Azadnia, P., Zamani H., Shah G., Khalegh A., Karimi M. & Taarof, N. (2011). Isolation and identification of thermophilic *Lactobacillus* from traditional yoghurts of tribes of Kaserum. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 10(6): 774-776.
- Batista, C. (2006). Influencia de una cultura starter termofílica sobre la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* e las características de queso minas fresco probiótico. Tesis de Master en Tecnología Bioquímica – Farmacéutica. Universidad de Sao Paulo. Brasil.
- Bogovic B., Rajsp K., Perko B. & Rogeli I. (2007). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal*. Vol. 17: 157 – 166.
- Brock T. (2006). *Biología de los microorganismos*. 11ava Edición. Editorial Prentice Hall Inc. México.
- Buriti, F., Okazaki T., Alegro J. & Saad S. (2007). Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Vol. 57 (2): 179.
- Caballero, A. (2005). *Guías metodológicas para los planes y tesis de maestría y doctorado*. Editorial Ugraph SAC. Lima – Perú. 672 p.
- Camacho, A., Giles M., Ortegón A., Palao M., Serrano B. & Velásquez O. (2009). *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. 2da Edición. Facultad de





- Química. UNAM. México.
- Carr, J., Chill D. & Maida N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. Vol. 28 (4): 281 – 370.
- Casal J. & Mateu E. (2003). Tipos de muestreo. *Rev. Epidem. Med. Prev.* Vol. 1: 3 – 7.
- Cástulo, M., Gómez H. & Alaniz R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *Revista e – Gnosis*. Vol. 6 (5): 17.
- Corrales, A., Henderson M. & Morales I. (2007). Sobrevivencia de microorganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en helado batido. *Revista Chilena de Nutrición*. Vol. 32 (2): 157.
- Corzo, D. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. Trabajo científico. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* Vol. 43 (3): 81 – 86.
- Cristóbal, R. & Maurtua D. (2003). Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. *Rev. Panam. Salud Pública / Pan Am J PublicHealth*. Vol. 14 (3): 158 – 164.
- Dabés, A., Santos W. & Pereira E. (2001). Atividade antimicrobiana de bacterias lácticas aisladas de productos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. *Arq Bras Med Vet Zootec*. Vol. 53 (1): 136 – 140.
- Delves J., Blackburn P., Evans J. & Hugenholtz J. (1996) Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 69: 193 – 202.
- Duran, C., Palmero J., Chaparro L., García T. & Sánchez E. (2010). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de quesos de cabra en Carora, estado Lara, Venezuela. *Rev. Zootecnia Trop*. Vol. 28 (4): 467 – 475.
- EBI, European Bioinformatics Institute. (2005). Bacteria Genomes – *Lactobacillus acidophilus*. Página web: [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk). Fecha de revisión: mayo 2019.
- Eck, A. & Gillis J. 2000. *Cheesemaking: From Science to Quality Assurance*. 2da Edición. Intercept Limited. París. 831 p.
- FAO, United Nations Food and Agriculture Organization. (1992). *Manual of food quality control: microbiological analysis*. Roma.
- FAO. Food and Agricultural Organization. (2000). Equipo regional de fomento y capacitación para América Latina. *Manual de elaboración de quesos*. Santiago de Chile.
- Forbes, B., Sahm D. & Weissfeld A. (2004). *Diagnóstico microbiológico*. 11ava edición



- Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires - Argentina.
- Fundación para la Innovación Agraria de Chile. (2007). Elaboración de productos con leche de cabra y vaca. Ministerio de Agricultura Santiago de Chile. Diciembre.
- García, M. Revah S. & Gómez L. (1998). Productos lácteos. En Biotecnología Alimentaria, Limusa Noriega Editores. García Garibay M. Quintero Ramírez Rodolfo, Agustín López-Munguía Canales. Compiladores. Pp. 163- 178. México D.F.
- Garde, S., Ávila M., Gaya P., Arias R. & Nuñez M. (2011). Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 150: 59 – 65.
- Garrido, R. (2014). Elaboración de queso fresco tipo mezcla (leche de cabra y leche de vaca) y determinación de sus características fisicoquímicas y sensoriales. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional de Piura. Piura – Perú. 112 p.
- González, L., Zárate V. (2015). Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* TF711 against *Clostridium sporogenes* when used as adjunct culture in cheese manufacture. *Journal of Dairy Research*. Vol. 82: 236 – 241.
- González, L. & Franco M. (2015). Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña. *Brazilian Journal of Food Technology*. Campinas. Vol. 18 (3): 250 – 257.
- González, C. (2010). Caracterización de la composición físico química del Queso fresco elaborado artesanalmente en Sehualaca, Tesis de Grado Médico veterinario zootecnista. Veracruz. Universidad Veracruzana.
- Guerrero, P., Gutiérrez M., Ávila M., Iñiguez M., Aceves A., González J. & Morales J. (2017). Recuento de bacterias ácido lácticas en lácteos fermentados comercializados en la región Ciénega de Jalisco. *Investigaciones en Ciencias e Inocuidad de Alimentos*. Primera edición. Prometo Editores. Universidad de Guadalajara. Jalisco – México.
- Hernández, R., Fernández C. & Baptista M. (2014). Metodología de la Investigación. Sexta edición. Editorial McGraw Hill Education. México. 600 p.
- Hernández, C. & Ayala E. (2018). Elaboración de queso fresco a base de leche con adición de aceituna verde (*Olea europea* L.). Tesis de Ingeniero de Alimentos. Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos. Universidad Nacional del Callao. Callao – Perú. 177.



- Ibáñez V. (2009). Diseños Estadísticos. Facultad de Ingeniería Estadística e Informática, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 274 p.
- INDECOPI, Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual. (2004). Leche y Productos Lácteos. Queso fresco. Requisitos. Norma Técnica Peruana: NTP 202.195. 2da edición. Lima – Perú.
- INS, Instituto Nacional de Salud. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de Normas Técnicas N° 30. Ministerio de Salud. Lima – Perú. 67 p.
- Jay, M. (2000). Modern food microbiology. 6th edition, Aspen publication, Gaithersburg, Maryland, USA
- Jurado, H. & Guzmán M. (2015). Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. Rev. Med. Vet. Zoot. Vol. 62 (2): 23 - 39.
- Klaenhammer, R., Barrangou R., Buck L., Azcárate A. & Altermann E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria affecting bioprocessing and health. FEMS Microbiology Reviews. Vol 29: 393 - 409.
- Langa, S, Landete M., Martín I., Rodríguez E., Arqués L. & Medina M. (2013). *In situ* reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products. Food Control. Vol. 33: 200 – 206.
- Langa, S., Martín I., Montiel R., Peirotén A., Arqués L. & Medina M. (2018). Protective effect of reuterin – producing *Lactobacillus reuteri* against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in semi – hard cheese. Food Control. Vol. 84: 284 – 289.
- Larrea, H., Flórez M. & Huapaya J. (2007). Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I. Revista Horizonte Médico. Vol. 7 (1): 16 – 22.
- Law, B. & Tamime, A. 2011. Technology of cheesemaking. Segunda edición. Wiley Blackwell, Reino Unido. 512 p
- Madrid, A. (1996). Curso de Industrias Lácteas. Madrid - España. Editorial Mundi-Prensa. 1era Edición.
- Martín, I., Langa S., Gaya P., Rodríguez E., Landete M., Medina M. & Arqués L. (2017). Optimization of reuterin production in cheese by *Lactobacillus reuteri*. Journal of Food Science and Technology. Vol. 54: 1346 – 1349.
- Martínez, C, Bengoechea J., Bustos I., Rodríguez B., Requena T. & Pelaez C. (2010).



- Control of late blowing in cheese by adding lacticin 3147-producing *Lactococcus lactis* IFPL 3593 to the starter. *International Dairy Journal*. Vol. 20: 18 – 24.
- Mejía, L. (2001). Obtención de cepas de Lactobacilos. Su caracterización (*in vitro*) como potenciales prebióticos. Tesis de Magister Scientiae en Biotecnología de Microorganismos. Universidad de los Andes. Mérida – Venezuela.
- Morais, J. (2004). Estudio de adecuación de cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja guirra para la elaboración de queso. Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Morita, H., Toh H., Fukuda S., Horikawa H., Oshima K., Suzuki T. *et al.* (2008). Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Research*. Vol. 15: 151 – 161.
- Nikolic, M., Terzic A., Jovicic B., Begovic J., Golic N. & Ljubisa, T. (2008). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 122 (1-2): 162 – 170.
- Obando, M., Brito C., Schobitz R., Baez L. & Horzella M. (2010). Viabilidad de los microorganismos probióticos *Lactobacillus casei* O1, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* BB12 durante el almacenamiento de queso Cottage. *Vitae*. Vol. 17 (2): 141 – 148.
- Ortiz Y., Sanchez R., Gutierrez N., Leon J., Acosta C. & Sepulveda D. (2017). Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri*: Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. Vol. 100: 1 – 11.
- Ouwehand, C. (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: *Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects*. (S. Salminen y A. Von Wright, eds.). 2nd edition, p. 139-160. Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- Pascual, M. & Anderson R. (2000). *Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para los alimentos y bebidas*. Editorial Díaz de Santos. Madrid.
- Peralta, L. (2014). Actividad antagónica de bacterias ácido lácticas aisladas de queso fresco artesanal frente a *Listeria monocytógenes* y *Escherichia coli*. Tesis de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco. Cusco – Perú. 118 p.



- Prater, M. (2009). *Lactobacillus Acidophilus*. A Probiotic for Lactose Digestión, nutrition.suite101.com.
- Quisberth, S. (2007). Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* en niños menores a 5 años, en el Hospital del Niño “Dr. Ovidio Aliaga Uria” durante los meses de enero a marzo del 2007. Tesis de Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz – Bolivia. 88 p.
- Ramírez, F. (2010). Aislamiento de bacterias *Lactobacillus* sp y levaduras a partir de productos lácteos artesanales y evaluación de la capacidad antagonica *in vitro*, Bogotá - Colombia.
- Ramírez, M. (2005). Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis de Licenciatura en Químico en Alimentos. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, Hidalgo, México. 86 p.
- Ramírez, C. & Vélez J. (2016). Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. Información Tecnológica. Vol. 27 (6): 115 – 128.
- Rilla, N., Martínez B., Delgado T. & Rodríguez A. (2003). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* spp. lactis IPLA 729, a nisin Z producer. International Journal of Food Microbiology. Vol. 85: 23 – 33.
- Rojas, A. (2011). Manual de Microbiología: Conceptos y Práctica de Microbiología General. Taller de Publicaciones. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Colombia. 161 p.
- Romero, P., Leyva G., Cruz J. & Santos A. (2009). Evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema tropical mexicano de la región de Tonalá, Chiapas. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 8 (1): 111 – 119.
- Ronk, R. (1988). Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. Federal Register. Vol. 53: 11247 – 11251.
- Salminen, S., Deighton A., Benno Y. & Gorbach L. (1998). Lactic acid bacteria in health and disease. p. 211–54. Salminen, S., von Wright, A., eds. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 2nd ed. Marcel Dekker Inc. New York.
- Sánchez, J. & Feris J. (1998). Antibiograma: utilidad y limitaciones. Arch. Dom. Ped. Vol. 34, No. 3: 83 – 87.
- Savadogo, A., Ouattara C., Bassole I. & Traore A. (2006). Bacteriocins and lactic acid



- bacteria: A minireview. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 5: 678 – 683.
- Scott, R., Robinson R. & Wilbey R. (2002). *Fabricación de Queso*. Editorial Acribia, S.A. España. 488 p.
- Schaefer, L., Auchtung A., Hermans E., Whitehead D., Borhan B. & Britton A. (2010). The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology*. Vol. 156: 1589 – 1599.
- Schelegueda, I., Vallejo M., Gliemmo F., Marguet R. & Campos A. (2015). Synergistic antimicrobial action and potential application for fish preservation of a bacteriocin produced by *Enterococcus mundtii* isolated from *Odontesthes platensis*. *LWT-Food Science and Technology*. Vol. 64 (2): 794 – 801.
- Shirai, K., Guerrero I. & Lara P. (1996). Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*. Vol. 47: 125 – 137.
- Somers, B. & Taylor L. (1987). Antibotulinal effectiveness of nisin in pasteurized processed cheese spreads. *Journal of Food Protection*. Vol. 50: 842 – 848.
- Soomro, A., Masud T. & Anwaar K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health a review. *Pakistan J. Nutr.* Vol. 1 (1): 20 – 24.
- Stevens, M., Vollenweider S. & Lacroix C. (2011). The potential of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* as a broad spectrum preservative in food. En *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. C. Lacroix (ed.). Woodhead Publishing Ltd., p. 129-160.
- Tapia, Y. (2014). Evaluación de la influencia de las bacterias probióticas en queso tipo Paria. Tesis de Ingeniero Agroindustrial. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 136 p.
- Tortora, G., Funke B. & Case C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. 9na Edición. Editorial Médica Panamericana.
- Udayarajan, C. 2007. Relating physicochemical characteristics of cheese to its functional performance. Tesis Ph. D. of Philosophy Food Science. Universidad de Wisconsin-Madison. EE.UU.
- Vallejo, M., Etchechoury V., Horiszny C. & Marguet E. (2009). Inhibición de *Escherichia coli* O157:H7 por cepas *Lactobacillus* aisladas de queso ovino. *Rev. Analecta Veterinaria*. Vol. 29 (1): 15 – 19.
- Van Hekken, D. & Farkye N. (2003). Quesos hispanos. *Tecnología de los Alimentos* Revista de la Ciencia Láctea. Setiembre.



- Varnam, A. & Sutherland J. (1994). Leche y productos lácteos: tecnología química y microbiológica. 1ra edición. Editorial Acribia. España
- Vázquez, M., Suárez H. & Zapata S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista Chilena de Nutrición. Vol. 36 (1): 64 – 71.
- Vélez, J. 2009. Rheology and texture of cheese. Nova Science Publishers. EE.UU. 87-122.
- Viloche, J. & Tito C. (2007). Aislamiento de *Lactobacillus* nativos de productos de fermentación en la ciudad de Tacna. Rev. Ciencia y Desarrollo. N° 11: 61 – 66.
- Villegas, A. (2009). Tecnología de alimentos de origen animal. Manual de prácticas. Editorial Trillas. México D. F.
- Walstra, P. (2001). Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. España. Editorial Acribia.
- Winn, W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P. & Woods Gail. (2006). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th edition. Lippincott.
- Zambrano, M. (2010). Elaboración de queso fresco con la utilización de un fermento probiótico (*Lactobacillus acidophilus*). Tesis de pre grado. Ecuador. Escuela Politécnica Nacional de Quito.
- Zamora R., Martínez H., Montáñez J., Huerta U. & Pérez R. (2012). Estudio microbiológico de queso fresco adicionado con el probiótico *Saccharomyces boulardii*. Rev. Biológicas. Vol. 14 (2): 37 – 41.
- Zamudio, K. & Zavaleta A. (2003). Estudio del potencial probiótico de Lactobacilos aislados de fuentes naturales. Ciencia e Investigación, Barcelona – España.

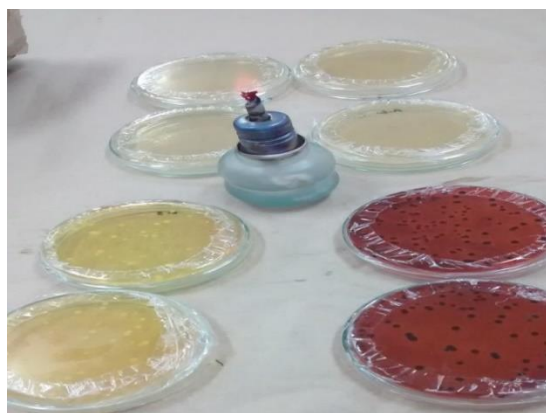
## ANEXOS



**Figura 11.** Adquisición de quesos frescos en los mercados de la ciudad de Puno, agosto – octubre 2017.



**Figura 12.** Preparación de los recuentos bacteriano en quesos, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.



**Figura 13.** Crecimiento de bacterias lácticas, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.





**Figura 14.** Preparación de las diluciones de McFarlan para las pruebas antagónicas, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.



**Figura 15.** Antagonismo de bacterias ácido lácticas sobre *E. coli* y *S. aureus*, laboratorio de Microbiología, FCCBB – UNA Puno, agosto – octubre 2017.

**Tabla 9.** Análisis de varianza de los recuentos de *Lactobacillus* sp, según meses de muestreo, agosto – octubre 2017.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Rcto Lactob	27	0.31	0.25	23.22

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.55	2	1.27	5.43	0.0113
Meses	2.55	2	1.27	5.43	0.0113
Error	5.63	24	0.23		
Total	8.17	26			

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.57001**  
 Error: 0.2344 gl: 24

Meses	Medias	n	E.E.
Ago	1.74	9	0.16 A
Set	2.02	9	0.16 A B
Oct	2.49	9	0.16 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Tabla 10.** Análisis de varianza de los recuentos de *Lactobacillus* sp, según mercados muestreados, agosto – octubre 2017.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Rcto Lactob	27	0.25	0.19	24.17

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.08	2	1.04	4.09	0.0297
MERCADOS	2.08	2	1.04	4.09	0.0297
Error	6.10	24	0.25		
Total	8.17	26			

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.59339**

Error: 0.2541 gl: 24

MERCADOS	Medias	n	E.E.
Laykakota	1.73	9	0.17 A
Central	2.11	9	0.17 A B
U y D	2.41	9	0.17 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Tabla 11.** Análisis de varianza de los diámetros de halo de inhibición sobre *E. coli* y *S. aureus*, agosto – octubre 2017.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Halos	12	0.85	0.83	12.17

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	310.08	1	310.08	54.56	<0.0001
Bacterias	310.08	1	310.08	54.56	<0.0001
Error	56.83	10	5.68		
Total	366.92	11			

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=3.06678**

Error: 5.6833 gl: 10

Bacterias	Medias	n	E.E.
<i>S. aureus</i>	24.67	6	0.97 A
<i>E. coli</i>	14.50	6	0.97 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Tabla 12.** Análisis de varianza de los diámetros de halo de inhibición de los tratamientos aplicados, agosto – octubre 2017.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Halos	12	0.05	0.00	30.13

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	18.75	1	18.75	0.54	0.4799
Tratamientos	18.75	1	18.75	0.54	0.4799
Error	348.17	10	34.82		
Total	366.92	11			

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=7.59058**

Error: 34.8167 gl: 10

Tratamientos	Medias	n	E.E.
Gentamicina	20.83	6	2.41 A
<i>Lactobacillus</i>	18.33	6	2.41 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).