



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Aislamiento de bacterias lácticas de alimentos lácteos: producción de bacteriocinas

Alumno: Gabriel Mateos Aparicio Romero de Ávila

Julio, 2016



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Aislamiento de bacterias lácticas de alimentos lácteos: producción de bacteriocinas

Gabriel Mateos Aparicio Romero de Ávila

Julio 2016

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Alimentos Lácteos.....	2
1.1.1. Elaboración del Queso.....	2
1.1.2. Microbiología de Alimentos Lácteos.....	4
1.1.3. Tipos de Quesos Estudiados.....	5
1.2. Bacterias Lácticas.....	8
1.3. Bacteriocinas.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
3.1. Alimentos utilizados en el trabajo.....	11
3.2. Material de Laboratorio.....	12
3.3. Medios de cultivo utilizados.....	12
3.4. Procesado de Alimentos.....	16
3.5. Crecimiento bacteriano.....	16
3.6. Tinción de Gram.....	17
3.7. Producción de bacteriocinas.....	18
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Presencia o ausencia de cepas bacterianas.....	20
4.2. Identificación mediante tinción de Gram.....	21
4.3. Localización de bacterias productoras de bacteriocinas.....	25
5. DISCUSIÓN.....	40
6. CONCLUSIONES.....	41
7. BIBLIOGRAFÍA.....	42

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas se llevan utilizando para la fabricación de alimentos desde hace miles de años. El uso más representativo es para la producción de productos lácteos fermentados, como es el queso.

Estas bacterias cobran importancia tras la fermentación de azúcares al producir ácido láctico y bacteriocinas, las cuales son muy utilizadas en la industria alimentaria y farmacéutica para prevenir microorganismos patógenos.

En este ensayo se intenta detectar la presencia de bacterias ácido lácticas en diferentes tipos de quesos, para observar la producción o no de bacteriocinas.

ABSTRACT

The lactic-acid bacteria have been used to food manufacturing since thousands of years. The most representative use is production of fermented milk products, like cheese.

This bacteria become important after the fermentation of sugars by producing lactic-acid and bacteriocins, which are widely used in the alimentary industry and the pharmaceutical one to prevent pathogenic microorganisms.

This essay try to achieve isolation of acid lactic bacteria in different types of cheese, to observe the production or absence of bacteriocins.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alimentos Lácteos

La leche y sus derivados forman un grupo de alimentos con un gran valor nutricional, ya que poseen magníficas cualidades. Son alimentos que poseen una elevada cantidad de proteínas con un elevado valor biológico, minerales y vitaminas, pero el aporte nutricional más importante de este grupo de alimentos es el calcio, por su fácil asimilación. Este conjunto de nutrientes son de vital importancia para las etapas de desarrollo y crecimiento, pero lo son también para el mantenimiento de la masa muscular y ósea del ser humano a lo largo de sus diferentes etapas de la vida.

En la actualidad, el grupo de alimentos de los lácteos tienen el mayor índice de consumo a escala mundial.

Los productos lácteos están compuestos por sustratos de crecimiento microbiano muy distintos a los de la leche líquida, ya que en algunas situaciones carecen de algunos nutrientes, los cuales si están presentes en la leche, y en otras ocasiones están muy concentrados o poseen un pH y una actividad de agua menor.

Nos centraremos en el queso, el cual es un producto alimenticio sólido o semisólido que se obtiene separando los componentes sólidos de la leche, la cuajada, de los líquidos, el suero. Cuanto más suero se extrae, más compacto es el queso. (Iziar y J.Alfredo, 1999)

1.1.1. Elaboración del Queso

Para la elaboración del queso se siguen los siguientes pasos, cada uno de ellos son importantes a la hora de elaborar un queso, y la obtención de los diferentes tipos de quesos dependerá de los tiempos o los contenidos de los pasos.

- 1) La obtención de la leche es la etapa inicial en la fabricación de quesos. Su contenido microbiano influye marcadamente en la calidad del queso (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).
- 2) Ajuste del contenido graso de la leche. Algunos quesos se elaboran con leche descremada y en ciertas variedades se incorpora grasa vegetal (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).
- 3) Homogenización de la leche. La reducción del diámetro de los glóbulos de la grasa durante el proceso de homogenización, se traduce en una cuajada más débil así como en una disminución de la sinéresis del suero, beneficio para quesos cremosos, y menos pérdida de grasa (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).
- 4) Pasteurización de la leche. Es un procedimiento general para lograr la inactivación de microorganismos patógenos; una proporción considerable de la población general microbiana es eliminada, lo que facilita el progreso de la fermentación (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).
- 5) Adición de cultivos iniciadores. En la elaboración de algunos quesos se utilizan cultivos microbianos que inducen cambios importantes en las características sensoriales del producto. Generalmente la leche se somete a una fermentación con cepas seleccionadas de BAL u hongos, o en algunos casos bacterias propiónicas. El producto puede ser madurado por semanas o meses. Los cultivos iniciadores consisten en una sola especie o mezclas de ellas (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).
- 6) Coagulación. Uso de renina o cuajo (enzima obtenida de la mucosa del cuarto estómago de terneras), la coagulación es completada al cabo de 30 min (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).
- 7) Separación de la cuajada y el suero. Esta separación se acelera por calentamiento, disminución del pH y manipulación del coágulo (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).
- 8) Corte de la cuajada. Según la forma de corte previo al desuerado, la textura del queso resultará afectada debido a que modifica la sinéresis inicial (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).
- 9) Desuerado. La cantidad de suero expulsado depende también de la forma de cortar la cuajada, de agitarla, y de la acidez y temperatura prevalentes (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

10) Moldeado. El moldeado tiene por finalidad dar al queso determinado formato y tamaño de acuerdo con sus características y de acuerdo con la tradición y exigencias del mercado. En general, al colocar la cuajada en los moldes se revisten éstos de tela o paño para facilitar la salida de algo de suero y formar la corteza. Los paños deben ser colocados de tal modo que no provoquen marcas ni arrugas en la superficie del queso. El formato y tamaño del queso tiene mucha influencia sobre la calidad del producto (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

11) Maduración. Es el proceso en el que evolucionan cambios físicos, químicos y sensoriales como consecuencia de la actividad de los cultivos microbianos agregados (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

12) Empacado. Una vez fabricado, el queso es empacado; se utiliza papel parafinado, envolturas plásticas, cajas de cartón, plástico o latas metálicas (Fernández, 2000; Keating y Rodríguez, 2002).

1.1.2. Microbiología de Alimentos Lácteos

La leche que no ha sido manipulada con ningún tratamiento posee una flora microbiana que suele estar compuesta por la mayoría de las bacterias de estos géneros: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Bacillus* las cuales están presentes tanto en la piel de la vaca y ubres como en las tuberías de ordeño y los utensilios utilizados. A parte de los citados géneros pueden aparecer coliformes y algunas bacterias patógenas como son *Brucella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aureoginosa*, *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*, provenientes principalmente de infecciones animales (Nickerson, 1985).

Al igual que la leche, el queso puede padecer deterioros a causa de la gran variedad de componentes orgánicos, como a un elevado contenido en agua, y a un pH próximo a la neutralidad. Los tipos de deterioros más importantes que se pueden observar en la leche son fermentaciones, proteólisis, mucosidad, diferentes coloraciones, y la emisión de sabores y aromas anormales.

Con los quesos frescos se le da importancia a la presencia de coliformes, o de cualquier materia extraña, actuando éstos como indicadores del ambiente sanitario en el que fueron producidos y madurados dichos quesos. Éstos quesos tienen mucha menos susceptibilidad a ser deteriorados por agentes microbianos que la leche, aguantando el desarrollo de numerosos microorganismos que padecen un deterioro más o menos importante, a causa de su menor contenido en agua (Hicks y col. 1982).

Los quesos más dispuestos al deterioro microbiológico son los que poseen un pH y humedad más o menos elevado y un contenido salino bajo. En la etapa de maduración se produce ocasionalmente deterioros a causa de la actividad de anaerobios esporulados como *Clostridium butyricum* y *Clostridium tyrobutyricum*, los cuales producen quesos inflados, o cuando está presente *Clostridium sporogenes* que induce el queso a un estado de putrefacción (Hicks y col. 1982).

La descomposición del queso puede ser a causa de la gasificación, la cual es debida a la actividad de coliformes y levaduras. (Massa y col. 1992).

Al igual que la leche, los quesos pueden mostrar olores desagradables, mucosidad, presencia de hongos y originar sabores desagradables, a causa de los microorganismos presentes en las leches alteradas.

1.1.3. Tipos de Quesos Estudiados

En la actualidad se conocen una gran variedad de tipos de quesos que se pueden clasificar según su maduración y dureza en ocho grupos: (Gil Martínez, 2006).

a) Queso muy duro

Posee un tiempo de maduración entre ocho meses y dos años. El más conocido internacionalmente es el parmesano, el cual es un queso semigraso, con una tonalidad amarilla y un tiempo de maduración superior a tres años. Otros quesos

de este grupo son el provolone, (fabricado a partir de leche de búfala) y en el caso de España, encontramos el queso manchego de Castilla la Mancha. Para su preservación, se recomienda evitar su resecación, aplicando trapos húmedos para taparlos y mantenerlos en lugares frescos.

b) Queso duro

Posee un periodo de maduración entre 4 y 10 meses. El más conocido es el Emmental, junto al Cheddar representativo de Inglaterra. En España es típico el queso rondeño de Málaga o el queso de Idiazábal del País Vasco. Su conservación es idéntica a la que se realiza con el queso muy duro.

c) Queso semiduro

Incluye entre un 49-57% del extracto seco, con un tiempo de curación comprendido entre 3 y 5 meses, lo que le da una textura más blanca y suave que el queso duro. El queso más importante de este grupo es el Gouda proveniente de Holanda. En España es reconocido el queso Acehuche de Cáceres. Se conservan igual que los quesos muy duros y duros.

d) Queso blando cremoso o mantecoso

Posee un contenido de extracto seco entre 44 y 55%, dando lugar a quesos blandos y cremosos. El queso más importante de este grupo es el Butterkäse de Alemania. En España pertenecen a este grupo el queso de Sierra Morena de Sevilla, el queso Torta de Casar de Cáceres y el queso de tetilla de Galicia.

Se incorporan a este grupo los quesos con moho, nombrados como de vena azul, a los cuales se les inocula un hongo que le proporciona la tonalidad verde-azul tan representativo de este grupo, el cual no es dañino para la salud en su consumo. Los más importantes de este grupo son el queso roquefort de Francia y el gorgonzola de Italia. En España es típico el queso cabrales de Asturias. Son conservados en refrigeración, donde se ralentiza el proceso de curación.

e) Queso blando con moho

Este tipo se distingue al resto por su curación, ya que los citados anteriormente, se les realiza la cura por todo el queso a la vez, mientras que este tipo se realiza desde fuera hacia dentro a causa de unas bacterias especiales como *Penicillium candidum*. Los más representativos son el camembert y el brie. En España es típico el queso pasiego de Cantabria.

Se conserva de la misma forma que los quesos blandos.

f) Queso fresco

Este tipo de quesos no necesita de curación, ya que se utilizan directamente los ingredientes frescos y coagulados de la leche. El más representativo de este grupo es el quark y la mozzarella. En España es típico el queso de Burgos.

Se conserva en refrigeración en 4°C, considerando delicadamente la fecha de caducidad establecida.

g) Queso de leche agria

Se fabrica con leche desnatada y fermentos lácticos, siendo típico de Alemania. En España es representativo de este grupo el requesón de Madrid. Se conserva del mismo modo que el queso fresco.

h) Queso fundido

Una vez el queso alcanza una temperatura de 80 o 90°C, se vuelve líquido y puede ser moldeado y se queda sin corteza. Esta elevada temperatura fulmina a las bacterias que realizan la curación por lo que el resultado de la fundición no se vuelve a transformar ni endurecer, pudiéndose conservar durante mucho más tiempo. Los métodos de conservación son semejantes a los del queso fresco y el queso de leche agria.

1.2. Bacterias Lácticas

Las bacterias lácticas (BAL) son un conjunto de microorganismos formado por diferentes géneros, los cuales tienen semejantes características como la fisiología, morfología y el metabolismo. Estas bacterias se relacionan a hábitats con abundancia en nutrientes como por ejemplo carnes, bebidas y en nuestro caso los lácteos. (Barakat y col. 2000; Carr y col., 2002).

Son bacterias Gram-positivas, no esporuladas, catalasa-negativas, oxidasa-negativas, sin citocromos, no aerobias pero aerotolerantes, acidúricas y exclusivamente fermentativas con el ác. láctico como principal producto final durante la fermentación de azúcares (Axelsson, 1998).

Principalmente las BAL son mesófilas, pero podemos encontrar géneros que son aptas para crecer y desarrollarse a temperaturas muy bajas hasta 5°C y otros que llegan a alcanzar temperaturas tan elevadas como 45°C. Respecto al pH idóneo para su crecimiento, encontramos algunas que pueden crecer a un pH de 3, otras oscilan entre 6 y 9, pero la gran mayoría están adecuadas a un pH de 4 y 4,5 (Jay, 1994).

1.3. Bacteriocinas

En la definición original, el término bacteriocina se refirió a las proteínas, caracterizadas por su biosíntesis letal, actividad intraespecífica y capacidad de adsorción a receptores de membrana específicos (Tagg et al., 1976). Actualmente las bacteriocinas se definen como: "macromoléculas que contienen proteínas que pueden ejercer una actividad bactericida hacia bacterias taxonómicamente relacionadas con la cepa productora" (Jack et al., 1995). La mayoría de las bacteriocinas se producen durante la fase exponencial de crecimiento y se ha observado que su cantidad en el medio de cultivo, es directamente dependiente de la cantidad de biomasa producida (De Vuyst y Vandamme, 1994).

Debido a la amplia variedad de bacteriocinas, es necesaria una clasificación. Klaenhammer propone una clasificación de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas basándose en las siguientes características: la composición química, la estructura secundaria y el mecanismo de acción (Klaenhammer, 1993).

Las bacteriocinas se dividen en:

1. Lantibióticos o péptidos pequeños (peso molecular <5 kDa) que contienen tipos de aminoácidos inusuales, tales como lantionina (Lan), la β -metil-lantionina (Melan) y aminoácidos como la deshidroalanina (DHA) y el deshidrobutirina (DHB); son representantes de esta clase la Nisina, la Lacticina 3147 producidas por cepas de *Lactococcus lactis* y la Stafilococcina C55 producidas por una cepa de *Staphylococcus aureus* (Navaratna et al., 1998);

2. Péptidos pequeños (peso molecular <5 kDa), estables al calor, no contienen tipos de aminoácidos inusuales, activos en la membrana de las células diana (Holck et al, 1992; Muriana y Klaenhammer, 1991)

3. Proteínas grandes (peso molecular > 30 kDa) lábiles al calor, como la Helveticina J, que se caracteriza por un peso molecular de 37 kDa y desactivada después de un tratamiento térmico a 100 °C durante 30 minutos (Joerger y Klaenhammer, 1986);

4. Bacteriocinas complejas, activas sólo si van vinculadas a uno o más componentes no proteicos, tales como hidratos de carbono o lípidos cadenas, tales como la Plantaricina S. En los últimos años, los estudios de bioquímica y de la genética de las bacteriocinas, se han centrado principalmente en los miembros de la primera y la segunda clase, dada la abundancia de estos péptidos y sus posibles aplicaciones tecnológicas, mientras que, las menos estudiadas son de la cuarta clase (McAuliffe et al., 2001).

Las bacteriocinas son producidas como metabolitos primarios; de hecho, se observó que sus cantidades en el medio de crecimiento es directamente dependiente de la cantidad de biomasa producida (De Vuyst y Vandamme, 1994). La variación de algunas condiciones de cultivo, tales como la temperatura, tiempo de fermentación, aireación y pH, pueden tener efectos importantes en la

producción de bacteriocinas. El desarrollo a temperaturas elevadas puede eliminar completamente la producción de bacteriocinas (Dajani y Taube, 1974), lo que conduce a veces a la pérdida irreversible de sus propiedades.

Las bacteriocinas actúan contra microorganismos no deseados o patógenos, estrechamente relacionados con el deterioro de los alimentos y causantes de enfermedades, por esta razón, se utilizan en diversas aplicaciones como son la biopreservación, la extensión en la vida útil, la acción antimicrobiana clínica y el control de la fermentación de la microflora. (Marcos et al., 2013). La adición directa de bacteriocinas purificadas o semipurificadas ofrece una mejor herramienta de control para los productos, ya que se puede alcanzar una mejor distribución y se evitan los cambios físicos, químicos y organolépticos que producen los procesos fermentativos.

2. OBJETIVOS

Los objetivos principales a realizar en este trabajo son:

-Desarrollar un análisis microbiológico de una gran variedad de quesos con el fin de estudiar la presencia o ausencia de bacterias lácticas.

-En el caso de encontrar presencia, comprobar su morfología con la tinción de Gram.

-Examinar la actividad antimicrobiana que producen las cepas aisladas frente a la presencia de *Enterococcus faecalis* S-47 y *Listeria innocua* 4030 mediante el ensayo de crecimiento en cruz.

-Con las cepas resistentes frente a *Enterococcus faecalis* S-47 y *Listeria innocua* 4030 obtenidas, analizar la producción de bacteriocinas examinando el halo de inhibición mediante las técnicas de ensayo en gota y ensayo en pocillos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Alimentos utilizados en el trabajo

Se recogieron 11 muestras diversas de diferentes tipos de quesos, los cuales 4 provenían del pequeño comercio y los 7 restantes de grandes superficies.

Las 11 muestras se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Relación de quesos utilizados en el trabajo.

Queso Azul [GS]
Queso Havarti [GS]
Queso Tierno Mezcla (Oveja, Cabra y Vaca) [PC]
Queso Semicurado Mezcla (Oveja, Cabra y Vaca) PC
Queso Semicurado Oveja PC
Queso Fresco [GS]
Queso de Cabra [GS]
Queso Maasdam [GS]
Queso Gorgonzola [GS]
Queso Emmental [GS]
Queso Tierno Mezcla (Oveja) PC

[PC]: Pequeño comercio

[GS]: Grandes superficies

3.2. Material de Laboratorio

El material utilizado en el laboratorio durante el trabajo es el siguiente:

- | | |
|----------------------------------|-------------------------|
| -Microscopio | -Balanza |
| -Placas de Petri | -Stomacher |
| -Asa de siembra | -Autoclave |
| -Pinzas estériles | -Mechero Bunsen |
| -Guantes | -Estufa |
| -Centrífuga | -Gradillas |
| -Pocillos | -Portas y cubre objetos |
| -Matraces (varios volúmenes) | -Solución salina |
| -Micropipetas (varios volúmenes) | -Safranina |
| -Pipetas | -Lugol |
| -Puntas de micropipetas | -Cristal Violeta |
| -Tubos Eppendorf | -Alcohol |
| -Tubos de ensayo | -Aceite de inmersión |
| -Bolsas pequeñas estériles | |

3.3. Medios de cultivo utilizados

3.3.1. MRS AGAR

Se trata de un medio selectivo para la producción de bacterias lácticas, como son las lactobacilos. El medio incluye peptona y glucosa, encargadas del crecimiento bacteriano, y citrato, el cual inhibe el crecimiento de bacterias Gram (-).

Composición:

Compuesto	g/L
Agar	10,00
Extracto de carne	8,00
Extracto de levadura	4,00
di-Amonio Hidrógeno Citrato	2,00
Magnesio Sulfato	0,20
Manganeso (II) Sulfato	0,05
Peptona Bacteriológica	10,00
D (+)-Glucosa	20,00
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	2,00
Sodio Acetato	5,00
Tween 80	1,00

pH 6,2±0,2

Preparación:

Se prepararon 800ml del medio, según las recomendaciones del fabricante, para el cual utilizamos 49,6 gr de MRS y 800 mL de agua destilada estéril, realizando la mezcla en un matraz que pudiese albergar dicho volumen, pesando con una balanza la cantidad exacta. Tras mezclar y agitar metemos el matraz en el autoclave a 115°C durante 20', para después dejarlo en un baño térmico a unos 50°C para bajar la temperatura. Tras atemperarse, el contenido del matraz se vierte sobre las placas Petri en condiciones de esterilidad, junto al mechero Bunsen para evitar posibles contaminaciones. Tras esto dejamos enfriar y al cabo de unos minutos se solidifica, momento en el que dejamos las placas en la cámara fría hasta el momento de ser necesitadas.

3.3.2. MRS Tamponado

Se utiliza para la producción de bacteriocinas.

Composición:

Compuesto	g/L	en 600mL (g)
MRS agar	62,00	37,20
Fosfato dibásico	10,00	6,00
Fosfato monobásico	4,30	2,58

Preparación:

Se prepararon 600 mL del medio, para el cual pesamos en la balanza las cantidades recomendadas por el fabricante, disolvimos en un matraz junto a 600 mL de agua destilada y autoclavamos. Finalmente repartimos el medio en placas de Petri antes de su solidificación.

3.3.3. MRS BROTH

Se trata de un medio selectivo para el desarrollo y crecimiento de bacterias lácticas, el cual está en estado líquido.

Composición:

Compuesto	g/L
Extracto de carne	8,00
Extracto de levadura	4,00
Proteosa peptona	10,00
Acetato de sodio	5,00
Citrato de triamonio	2,00
Sulfato de magnesio	0,20
Sulfato de manganeso	0,05
Fosfato dipotásico	2,00
D(+)-Glucosa	20,00
Polisorbato 80	1,00

pH 6,2±0,2 a 25°C

Preparación:

Se necesitan 200 mL de este medio, por lo que utilizamos 10.4 g según las recomendaciones del fabricante, utilizando la balanza para su peso exacto, se mezcla en un matraz junto a 200 mL de agua destilada esterilizada. Se lleva la mezcla a ebullición para su completa disolución, y se vierte sobre los tubos. Posteriormente se autoclava.

3.3.4. BHA BLANDO

Dicho medio se utilizó como sobrecapa tras haber inoculado las bacterias indicadoras en las placas Petri para el crecimiento de bacteriocinas.

Composición:

Componente	g/L	En 200 ml (g)
Agar	17,00	1,60
Fosfato dibásico	10,00	2,00
Fosfato monobásico	4,30	0,80
BHI	35,00	3,00

pH 7.2

Preparación:

Se necesitan 200 mL de este medio, por lo que pesamos las cantidades recomendadas por el fabricante en una balanza para ese volumen, lo llevamos al microondas unos minutos hasta su fundición para más tarde repartirlo a razón de 6ml por tubo. Se autoclava y una vez finalizado se mantienen en la cámara fría hasta su uso.

3.4. Procesado de alimentos

De cada tipo de queso seleccionado para ser estudiado, se pesaron 5 g de cada uno, y se sumergieron en bolsas herméticas estériles en las cuales habíamos introducido previamente 45mL de solución salina al 0,9%. Todas las bolsas con el contenido completo se llevaron al Stomacher para su trituración y homogeneización.

Posteriormente junto al mechero para evitar posibles contaminaciones, se realizaron diluciones decimales con 100 μ L de la solución original en un eppendorf junto a 0,9 mL de solución salina estéril.

Ambas soluciones, la original y la diluida son sembradas en placas Petri con medio MRS, utilizando 100 μ L de las muestras. La placa 0 posee 100 μ L de la solución original, y la placa 1 contendrá 100 μ L de la muestra diluida. Tras haber sembrado todas las placas, se dejarán en la estufa a 30°C durante 24-48h.

3.5. Crecimiento Bacteriano

Después de entre 48-72 horas de incubar las placas Petri en la estufa a unos 30°C se puede percibir el crecimiento de bacterias, con una gran variedad de colonias que aparecen en los medios preparados; con una punta de micropipeta y junto al mechero para evitar posibles contaminaciones, cogemos cada una de las colonias para inocularlas en MRS líquido.

Se picaron una representación de las bacterias lácticas, las cuales según el comerciante crecen en el medio como una colonia con tonalidad blanca y de tamaño pequeño.

Solo las colonias de estas características fueron seleccionadas para inocular, el resto que tuviese diferente tonalidad o tamaño fueron descartadas.

3.6. Tinción de Gram

Una vez seleccionadas las colonias se confirmó mediante la tinción de Gram la morfología y características de las bacterias lácticas.

Esta tinción nos permite examinar y diferenciar con exactitud, mediante los diversos colorantes y el microscopio, las bacterias Gram negativas de las Gram positivas. La clave de esta tinción está en la capa de peptidoglicano que poseen las bacterias en su pared, ya que en las bacterias Gram positivas es más gruesa, lo que permite al añadir el cristal violeta, que se quede dentro y le dé la tonalidad azul/morado, al contrario que las bacterias Gram negativas, la capa de peptidoglicano es más delgada, y al añadir alcohol arrastra consigo el colorante que no ha conseguido adherirse a la pared. Por lo que para distinguir las bacterias Gram positivas (las cuales están ya teñidas) de las Gram negativas (están sin teñir) se les añade Safranina para teñir las bacterias Gram negativas de color rojo y sea más fácil localizarlas en el microscopio, y contrastarlas con las positivas. De esta forma también se puede diferenciar la morfología que presentan las bacterias (bacilos, cocobacilos y cocos).

Preparación de la tinción:

-Se deposita una gota de agua destilada en el portaobjetos, y mediante un asa de siembra se extiende la colonia a ensayar.

-Fijamos con calor del mechero.

-Cubrimos la muestra con cristal violeta durante 2´.

-Se retira el cristal violeta y se añade Lugol durante 2´.

-Se decolora con el uso de alcohol al 96% durante 30´´, tras los cuales se retira con agua.

-Se añade safranina durante 3´, se lava con agua y se deja secar.

-Examinamos la muestra en el microscopio con 100x, añadiendo una gota de aceite de inmersión para ver las posibles morfologías de la muestra.

3.7. Producción de bacteriocinas

Para los ensayos de producción de bacteriocinas se utilizaron tanto un cultivo overnight en MRS en cada cepa mantenida en semilla como las semillas en MRS de cada cepa guardadas. Se ensayó la producción de bacteriocinas mediante tres ensayos: en cruz, en gota y en pocillos. En ambos casos se utilizaron *Listeria innocua* 4030 y *Enterococcus faecalis* S-47 como cepas indicadoras, las dos proporcionadas por el grupo de microbiología de la Universidad de Jaén.

3.7.1. Ensayo en Cruz

El ensayo se realizó en placas de Petri con MRS tamponado, las cuales se subdividieron en dos grupos, de 15 placas cada uno, en el que se diferenciaban en la cepa indicadora utilizada (uno con *Listeria innocua* y otro con *Enterococcus faecalis* S-47). En cada placa se siembran 5 cepas con una cruz por cada una de ellas. Se incuban en la estufa durante 24h a 30°C, y tras aparecer las cruces se extiende una sobrecapa de 6 mL de BHA blando, fundida y atemperada con 60 µL de la bacteria indicadora sobre la placa de MRS tamponado. Se incuban otras 24h y se observan los halos de inhibición alrededor de las cruces.

3.7.2. Ensayo en gota

Se obtiene un cultivo overnight en medio MRS líquido de cada una de las cepas a ensayar, se cogen 5 µL del sobrenadante, que son llevados a una placa Petri con MRS tamponado depositándose en forma de una gota de unos 5-6 mm. Se depositan unas 5 gotas por placa, de diferentes cepas, separadas bien entre ellas. Se incuban en la estufa a 30°C durante 24 horas. Tras crecer las gotas, se le añade una sobrecapa de BHA tamponado en la que van 60 µL de la cepa indicadora *Listeria innocua* o *Enterococcus faecalis*. Se incuban 24 horas a 37°C, y tras esto se pudo examinar el halo de inhibición que presentó cada cepa.

3.7.3. Ensayo en pocillos

Del cultivo overnight de cada cepa se recogen 800 μ L que se centrifugan a 13.000 rpm durante 10', separando así el medio de cultivo y restos celulares que quedan en el fondo, de las bacteriocinas que se encuentran en la parte superior del sobrenadante. Más tarde, a la vez que se van fundiendo las sobrecapas que utilizaremos posteriormente, las cuales se dejan en el baño para reducir su temperatura hasta su uso, colocamos en las placas preparadas de MRS tamponado las torres de acero inoxidable esterilizadas, con unas dimensiones de 8mm de diámetro, 1 cm de alto y con una capacidad de 85 μ L. Situamos entre 5 y 6 torres por placa, a una distancia suficiente para no interferir los resultados obtenidos entre distintas muestras, y se marca cada uno para poder ser identificados más tarde.

Una vez situadas las torres, colocamos 60 μ L de las bacterias indicadoras, *Listeria innocua* o *Enterococcus faecalis*, junto a 6 mL de la sobrecapa de BHA blando, para más tarde añadirlo a la placa y extenderlo con precaución por toda la placa de manera uniforme sin sobrepasar los límites de las torres. Tras haber solidificado la sobrecapa, procedemos a retirar con cuidado las torres mediante el uso de pinzas esterilizadas, dejando tras de sí un pocillo, el cual será rellenado con 85 μ L de los sobrenadantes de cada muestra. A continuación se llevan a la estufa a 37°C durante 24h; tras este plazo podremos examinar la presencia o ausencia del halo de inhibición y sus dimensiones. Todo este proceso se realiza dos veces, una para la bacteria indicadora *Listeria innocua* y otra para la *Enterococcus faecalis*.

4. RESULTADOS

Tras realizar todos los procedimientos descritos anteriormente, comenzamos a analizar y examinar los resultados obtenidos para establecer una evaluación.

4.1. Presencia o ausencia de bacterias lácticas

Una vez sembrada una placa original (0) con el queso homogeneizado con la solución salina, y otra placa diluida (1) con la muestra original diluida con solución salina, son llevadas a la estufa a 30°C durante 48h a la espera de algún crecimiento.

Cepa	Queso	48 horas
A	Azul	+
B	Havarti	+
C	Tierno Mezcla (Oveja, Cabra, Vaca)	+
D	Semicurado Mezcla	+
E	Semicurado Oveja	+
F	Fresco	+
G	Cabra	+
H	Maasdam	+
I	Gorgonzola	+
K	Emmental	+
L	Tierno Mezcla (Oveja)	+

Tabla 2. Presencia o ausencia de colonias en las placas de MRS agar, tras 48 horas de la siembra.

Como se observa en la tabla 2, tras haber transcurrido 48 horas, en la totalidad de las placas se ha producido crecimiento, por lo que no es necesario dejar las placas en incubación por más tiempo.

Esto es debido al elevado contenido de bacterias lácticas presentes en los diferentes tipos de quesos, las cuales proliferaron rápidamente en las condiciones óptimas proporcionadas por la estufa.

Una vez identificadas el tipo de colonias que nos indica el medio de cultivo como posibles bacterias lácticas, recogemos las colonias de cada placa con las características típicas tonalidad blanquecina y un tamaño pequeño. Estas son sembradas en MRS líquido para dejarlas crecer y ser examinadas mediante la tinción de Gram en el microscopio.

4.2. Identificación mediante tinción de Gram

Una vez crecidas las colonias que se han obtenido en MRS líquido, utilizamos la tinción de Gram para examinar que tipo de cepas son, que morfologías presentan y diferenciar entre que bacterias son Gram positivas o Gram negativas.

Los datos obtenidos tras la observación microscópica se muestran en una serie de tablas agrupadas por los distintos tipos de quesos (tablas 3-13). En la gran mayoría presentaban morfología de bacilo, la cual es típica de las bacterias BAL, junto a algunos cocos puntuales. (Fig.1).

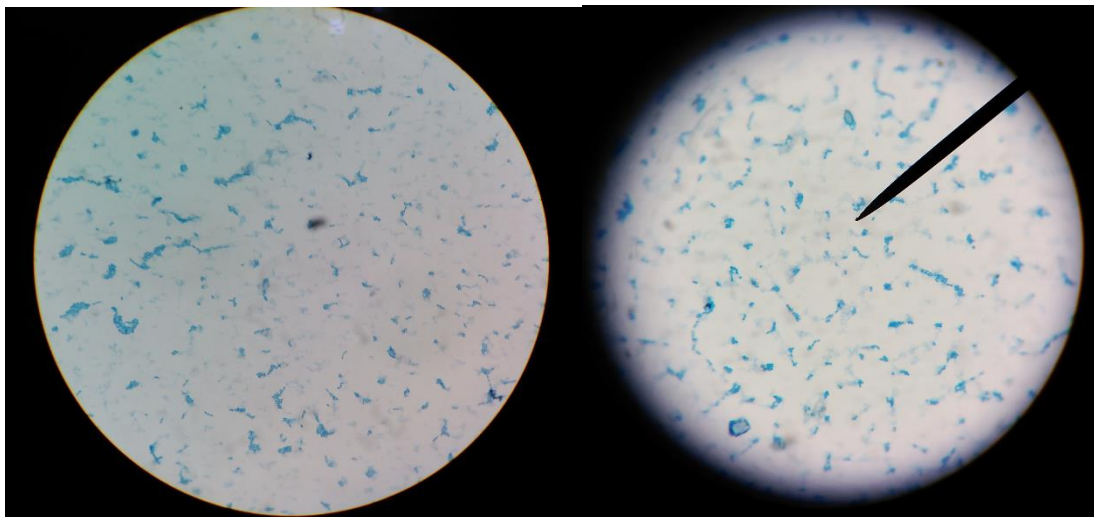


Figura 1: Tinción Gram positiva al microscopio

Queso	Cepa	Morfología	Tinción
Azul	A1	Bacilo	Gram (+)
	A2	Bacilo	Gram (+)
	A3	Bacilo	Gram (+)
	A4	Bacilo	Gram (+)

Tabla 3. Tinción de Gram de las distintas cepas de queso Azul

Queso	Cepa	Morfología	Tinción
Havarti	B1	Bacilo	Gram (+)
	B2	Bacilo	Gram (+)
	B3	Bacilo	Gram (+)
	B4	Bacilo	Gram (+)
	B5	Bacilo	Gram (+)

Tabla 4. Tinción de Gram de las distintas cepas de queso Havarti

Queso	Cepa	Morfología	Tinción
Tierno Mezcla (O, C, V)	C1	Bacilo	Gram (+)
	C2	Bacilo	Gram (+)
	C3	Bacilo	Gram (+)
	C4	Bacilo	Gram (+)

Tabla 5. Tinción de Gram de las distintas cepas de queso Tierno Mezcla (O,C,V)

Queso	Cepa	Morfología	Tinción
Semicurado Mezcla	D1	Bacilo	Gram (+)
	D2	Bacilo	Gram (+)
	D3	Bacilo	Gram (+)
	D4	Bacilo	Gram (+)
	D5	Bacilo	Gram (+)

Tabla 6. Tinción de Gram de las distintas cepas de queso Semicurado Mezcla

Queso	Cepa	Morfología	Tinción
Semicurado Oveja	E1	Bacilo	Gram (+)
	E2	Bacilo	Gram (+)
	E3	Bacilo	Gram (+)
	E4	Bacilo	Gram (+)
	E5	Bacilo	Gram (+)

Tabla 7. Tinción de Gram de las distintas cepas de queso Semicurado Oveja

Queso	Cepa	Morfología	Tinción
Fresco	F1	Bacilo	Gram (+)
	F2	Bacilo	Gram (+)
	F3	Bacilo	Gram (+)
	F4	Bacilo	Gram (+)

Tabla 8. Tinción de Gram de las distintas cepas de queso Fresco

Queso	Cepa	Morfología	Tinción
Cabra	G1	Bacilo	Gram (+)
	G2	Bacilo	Gram (+)
	G3	Bacilo	Gram (+)
	G4	Bacilo	Gram (+)

Tabla 9. Tinción de Gram de las distintas cepas de queso de Cabra

Queso	Cepa	Morfología	Tinción
Maasdam	H1	Bacilo	Gram (+)
	H2	Bacilo	Gram (+)
	H3	Bacilo	Gram (+)
	H4	Bacilo	Gram (+)

Tabla 10. Tinción de Gram de las distintas cepas de queso Maasdam

Queso	Cepa	Morfología	Tinción
Gorgonzola	I1	Bacilo	Gram (+)
	I2	Bacilo	Gram (+)
	I3	Bacilo	Gram (+)
	I4	Bacilo	Gram (+)
	I5	Bacilo	Gram (+)

Tabla 11. Tinción de Gram de las distintas cepas de queso Gorgonzola

Queso	Cepa	Morfología	Tinción
Emmental	K1	Bacilo	Gram (+)
	K2	Bacilo	Gram (+)
	K3	Bacilo	Gram (+)
	K4	Bacilo	Gram (+)
	K5	Bacilo	Gram (+)

Tabla 12. Tinción de Gram de las distintas cepas de queso Emmental

Queso	Cepa	Morfología	Tinción
Tierno Oveja	H1	Bacilo	Gram (+)
	H2	Bacilo	Gram (+)
	H3	Bacilo	Gram (+)
	H4	Bacilo	Gram (+)
	H5	Bacilo	Gram (+)

Tabla 13. Tinción de Gram de las distintas cepas de queso Tierno Oveja

En resumen, en la totalidad de cepas hemos obtenido la presencia de bacilos, exceptuando en dos cepas donde se obtuvo Gram (-), en E5 y F4 correspondientes al queso semicurado de oveja y al queso fresco.

Si tenemos en cuenta el número de posibles bacterias lácticas aisladas de cada queso, como se muestra en la figura 2 el mayor porcentaje de aislados se obtuvo en el queso Havarti, Semicurado mezcla, Gorgonzola, Emmental y Tierno Oveja. Destacando por menos el queso fresco.

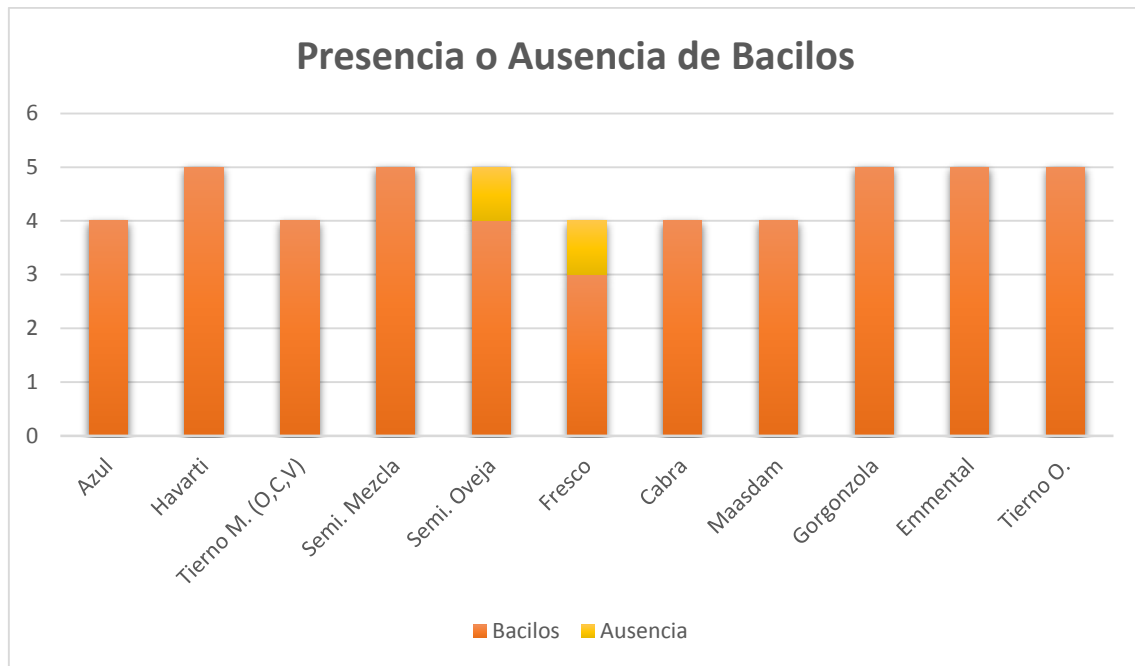


Figura 2. Representación gráfica de la presencia o ausencia de bacilos en las distintas muestras

4.3. Detección de bacterias productoras de bacteriocinas

Tras haber obtenido todas las cepas de bacterias Gram (+) de los diferentes tipos de muestras, procedemos a analizar la actividad antimicrobiana a través de presencia de halo de inhibición que aparecerá en el contorno de las cepas ensayadas frente a las indicadoras utilizadas, *Listeria innocua* 4030 y *Enterococcus faecalis* S-47.

Para analizar esta actividad y así averiguar el grado de inhibición producido por nuestras cepas frente a las bacterias indicadoras, se llevaron a cabo tres ensayos diferentes:

4.3.1. Ensayo en cruz

Se sembraron en forma de cruz las cepas a ensayar, unas cinco cruces por placa, y una vez crecidas se le añadió una sobrecapa de BHA blando con las bacterias indicadoras ya incluidas, lo que nos permite observar el halo de

inhibición que producen las distintas cepas frente a las bacterias indicadoras. Se observó la presencia o ausencia del halo, con (+) para la presencia y (-) para la ausencia, y para mostrar el grado de inhibición se utilizaron mayor número de (+), proporcional al dicho grado. En las figuras 3 y 4 se muestran el resultado obtenido en algunas cepas.



Figura 3. Resultado del halo de inhibición frente a *Listeria innocua* 4030

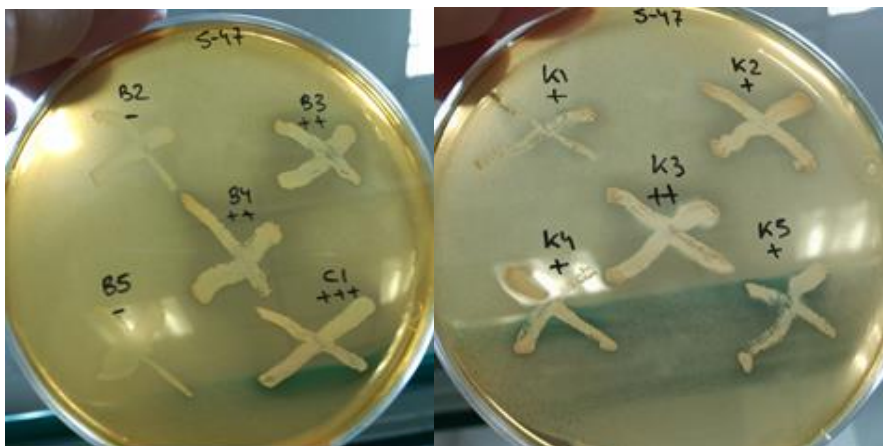


Figura 4. Resultado del halo de inhibición frente a *Enterococcus faecalis*

Queso Azul	<i>Listeria innocua</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
A1	++	-
A2	++	++
A3	++	+
A4	+	-

Tabla 14. Ensayo en cruz, análisis de la actividad antimicrobiana de BAL en queso azul

En todas las cepas del queso azul (tabla 14) se obtuvo actividad antimicrobiana, especialmente en la A2 y A3, ya que en las A1 y A4 solo mostraron actividad frente a *Listeria innocua*.

Queso Havarti	<i>Listeria innocua</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
B1	-	-
B2	-	-
B3	+++	++
B4	+++	++
B5	-	-

Tabla 15. Ensayo en cruz, análisis de la actividad antimicrobiana de BAL en queso Havarti

En las cepas de queso Havarti (tabla 15), tan solo mostraron actividad antimicrobiana las cepas B3 y B4, con un excelente grado de inhibición, frente a las dos bacterias ensayadas.

Queso Tierno Mezcla (O, C, V)	<i>Listeria innocua</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
C1	++++	++++
C2	+++	++
C3	+++	++
C4	+++	++

Tabla 16. Ensayo en cruz, análisis de la actividad antimicrobiana de BAL en queso tierno mezcla (O,C,V)

En el queso tierno mezcla (O,C,V), (tabla 16) todas las cepas mostraron actividad antimicrobiana, con un elevado grado de inhibición en todas ellas y frente a las dos bacterias ensayadas.

Queso Semicurado Mezcla	<i>Listeria innocua</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
D1	+++	+
D2	+	++
D3	+++	+
D4	+++	+
D5	+++	++

Tabla 17. Ensayo en cruz, análisis de la actividad antimicrobiana de BAL en queso semicurado mezcla

En el queso semicurado mezcla (tabla 17) se obtuvo actividad antimicrobiana en todas las cepas con un elevado grado de inhibición en todas ellas, exceptuando la D2 que obtuvo un menor halo que el resto.

Queso Semicurado Oveja	<i>Listeria innocua</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
E1	+++	+
E2	+++	+++
E3	+++	++
E4	+++	++
E5	+	+++

Tabla 18. Ensayo en cruz, análisis de la actividad antimicrobiana de BAL en queso semicurado oveja

En el queso semicurado oveja (tabla 18) se obtuvo actividad antimicrobiana en todas las cepas con un elevado grado de inhibición en todas ellas.

Queso Fresco	<i>Listeria innocua</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
F1	+++	+
F2	-	-
F3	-	+
F4	-	-

Tabla 19. Ensayo en cruz, análisis de la actividad antimicrobiana de BAL en queso fresco

En el queso fresco (tabla 19) tan solo se obtuvo actividad antimicrobiana en la cepa F1, y un mínimo halo en la cepa F3 frente a *Enterococcus faecalis*.

Queso Cabra	<i>Listeria innocua</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
G1	+++	++
G2	++++	++
G3	+++	++
G4	-	-

Tabla 20. Ensayo en cruz, análisis de la actividad antimicrobiana de BAL en queso cabra

En el queso de cabra (tabla 20) se obtuvo una elevada actividad antimicrobiana en todas las cepas menos la G4 que no tuvo ninguna actividad.

Queso Maasdam	<i>Listeria innocua</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
H1	+	-
H2	-	-
H3	-	-
H4	++	+

Tabla 21. Ensayo en cruz, análisis de la actividad antimicrobiana de BAL en queso Maasdam

En el queso Maasdam (tabla 21) solo se obtuvo actividad antimicrobiana en la cepa H1 (frente a *Listeria innocua*) y en la cepa H4 (frente a ambas bacterias) con una ligera mayor actividad.

Queso Gorgonzola	<i>Listeria innocua</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
I1	+++	++
I2	++	++
I3	++	+
I4	+++	++
I5	+++	++

Tabla 22. Ensayo en cruz, análisis de la actividad antimicrobiana de BAL en queso Gorgonzola

En el queso Gorgonzola (tabla 22) se obtuvo una alta actividad en todas las cepas presentes frente a ambas bacterias indicadoras, con unos halos de grandes dimensiones. La cepa que menor actividad presentó fue la I3.

Queso Emmental	<i>Listeria innocua</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
K1	++	+
K2	+++	+
K3	+++	++
K4	+++	+
K5	++	+

Tabla 23. Ensayo en cruz, análisis de la actividad antimicrobiana de BAL en queso Emmental

En el queso Emmental (tabla 23) se obtuvo actividad antimicrobiana en todas las cepas, con mayor actividad frente a la *Listeria innocua* que frente a *Enterococcus faecalis*, y la cepa K3 es la más actividad presenta.

Queso Tierno Mezcla	<i>Listeria innocua</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
L1	+++	+++
L2	+++	+++
L3	+++	+++
L4	+++	+++
L5	+++	+++

Tabla 24. Ensayo en cruz, análisis de la actividad antimicrobiana de BAL en queso tierno mezcla

En el queso tierno mezcla (tabla 24) se obtuvo una muy elevada actividad en todas las cepas, con unos halos similares tanto entre cada cepa como frente a las distintas bacterias indicadoras.

4.3.2. Ensayo en gota

Para este ensayo se utilizaron las muestras que mostraron actividad antimicrobiana en el ensayo en cruz, 41 cepas.

El objetivo de este ensayo es estudiar la presencia o ausencia de bacteriocinas y la actividad antimicrobiana frente a las cepas indicadoras *Listeria innocua* y *Enterococcus faecalis*. Se sembraron las placas de MRST con 5 µL de las muestras en medio líquido. Tras 24h se comprueba el crecimiento de cada una de las gotas. Más tarde se le añade BHA blando con las cepas indicadoras inoculadas y se llevan a la estufa a 37°C durante 24h para observar el grado de inhibición producido por las cepas obtenidas en las distintas muestras de quesos, donde medimos el diámetro del halo producido por la inhibición.

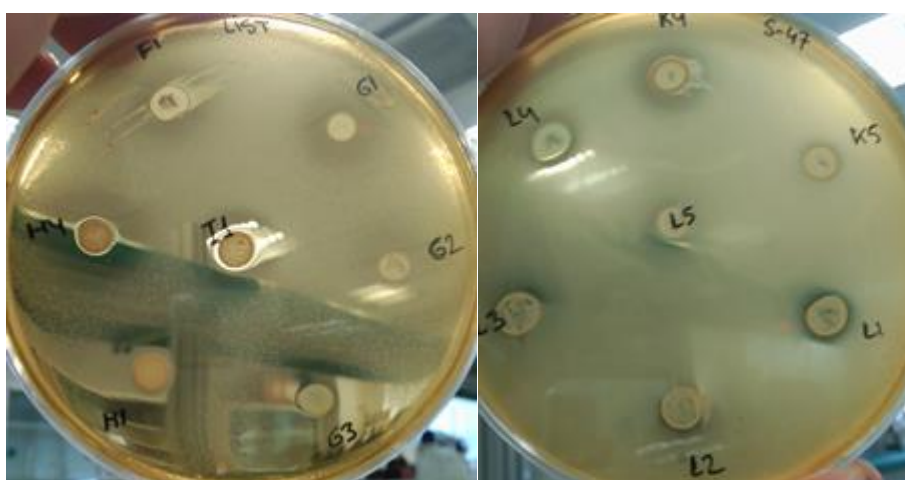


Figura 5. Resultado del halo de inhibición en el ensayo en gota.

En la figura 5 y en las tablas (25-35) se muestra el resultado de la inhibición producida por las cepas, donde aparecen halos de distintos diámetros.

Cepas	<i>Listeria innocua</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Presencia	Halo (mm)	Presencia	Halo (mm)
A1	-	0	-	0
A2	+	9	+	10
A3	+	8	-	0
A4	-	0	-	0

Tabla 25. Resultados en el ensayo en gota del halo de inhibición en queso Azul

Como se observa en la tabla 25, la cepa A2 de queso Azul presenta halos de inhibición frente a las dos bacterias indicadoras, y la cepa A3 tan solo frente a *Listeria innocua*.

Cepas	<i>Listeria innocua</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Presencia	Halo (mm)	Presencia	Halo (mm)
B3	+	11	-	0
B4	+	13	+	7

Tabla 26. Resultados en el ensayo en gota del halo de inhibición en queso Havarti

Se observa en la tabla 26 podemos ver que las cepas B3 y B4 de queso Havarti presentan halos frente *Listeria innocua*, pero solo la cepa B4 también presenta frente a *Enterococcus faecalis*.

Cepas	<i>Listeria innocua</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Presencia	Halo (mm)	Presencia	Halo (mm)
C1	+	13	+	9
C2	+	14	+	9
C3	+	12	+	9
C4	+	7	+	8

Tabla 27. Resultados en el ensayo en gota del halo de inhibición en queso Tierno Mezcla (O,C,V)

En cuanto al queso tierno mezcla (tabla 27), las cepas presentaron halo de inhibición, con similares diámetros entre sí, excepto la cepa C4 que presentó un menor diámetro.

Cepas	<i>Listeria innocua</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Presencia	Halo (mm)	Presencia	Halo (mm)
D1	+	12	+	9
D2	+	13	+	12
D3	+	15	+	15
D4	+	12	+	7
D5	+	10	+	8

Tabla 28. Resultados en el ensayo en gota del halo de inhibición en queso Semicurado mezcla

En la tabla 28 se observa que las cepas de queso semicurado presentaron halos de inhibición, donde la cepa D3 obtuvo el mayor grado con el diámetro más elevado seguida de la cepa D2. El resto fueron aproximadamente similares.

Cepas	<i>Listeria innocua</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Presencia	Halo (mm)	Presencia	Halo (mm)
E1	+	14	+	7
E2	+	15	+	8
E3	+	17	+	8
E4	+	15	+	8
E5	+	14	+	7

Tabla 29. Resultados en el ensayo en gota del halo de inhibición en queso Semicurado Oveja

Como se observa en la tabla 29 de queso de oveja, las cepas presentaron halos de inhibición, donde todas obtuvieron diámetros similares, excepto la cepa E3 que obtuvo un mayor diámetro frente a *Listeria innocua* que el resto.

Cepas	<i>Listeria innocua</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Presencia	Halo (mm)	Presencia	Halo (mm)
F1	+	15	+	8

Tabla 30. Resultados en el ensayo en gota del halo de inhibición en queso Fresco

Con respecto a la única cepa de queso fresco, tabla 30, presentó halo de inhibición similar a la media obtenida en el resto de cepas.

Cepas	<i>Listeria innocua</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Presencia	Halo (mm)	Presencia	Halo (mm)
G1	+	15	-	0
G2	+	14	-	0
G3	+	17	-	0

Tabla 31. Resultados en el ensayo en gota del halo de inhibición en queso de Cabra

En la tabla 31 se observan los resultados del queso de cabra, las cepas sólo presentaron halo frente a *Listeria innocua*, ya que no apareció ningún halo frente a *Enterococcus faecalis*.

Cepas	<i>Listeria innocua</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Presencia	Halo (mm)	Presencia	Halo (mm)
H1	+	15	-	0
H4	+	16	+	10

Tabla 32. Resultados en el ensayo en gota del halo de inhibición en queso Maasdam

En el queso Maasdam se observa (tabla 32) que ambas cepas presentaron halos de inhibición frente a *Listeria innocua*, pero solo la cepa H4 presentó frente a *Enterococcus faecalis*.

Cepas	<i>Listeria innocua</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Presencia	Halo (mm)	Presencia	Halo (mm)
I1	+	17	+	13
I2	+	12	+	13
I3	+	12	+	9
I4	+	12	+	10
I5	+	10	+	10

Tabla 33. Resultados en el ensayo en gota del halo de inhibición en queso de Gorgonzola

Para el queso Gorgonzola, tabla 33, todas las cepas presentaron halo de inhibición frente a ambas bacterias indicadoras, donde la cepa I1 mostró el mayor diámetro frente a *Listeria innocua*, y la cepa I3 mostró el menor diámetro frente a *Enterococcus faecalis*.

Cepas	<i>Listeria innocua</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Presencia	Halo (mm)	Presencia	Halo (mm)
K1	+	20	+	13
K2	-	0	-	0
K3	+	17	+	9
K4	+	10	+	12
K5	+	7	+	7

Tabla 34. Resultados en el ensayo en gota del halo de inhibición en queso Emmental

En la tabla 34 vemos los resultados del queso Emmental, donde que todas las cepas menos la K2 presentaron halos de inhibición frente a ambas bacterias indicadoras. La cepa K3 presentó el mayor grado de inhibición, y la cepa K5 fue la que menor grado presentó.

Cepas	<i>Listeria innocua</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Presencia	Halo (mm)	Presencia	Halo (mm)
L1	+	12	+	9
L2	+	10	+	8
L3	+	10	+	9
L4	+	12	+	9
L5	+	12	+	7

Tabla 35. Resultados en el ensayo en gota del halo de inhibición en queso Tierno Mezcla (O)

Por último, en la tabla 35, se reflejan los resultados del queso tierno, donde todas las cepas presentaron halos de inhibición frente a ambas bacterias indicadoras con similares diámetros.

Como resumen de los resultados obtenidos en el ensayo en gota, hemos encontrado de las 41 cepas ensayadas 38 posibles productoras de bacteriocinas frente a *Listeria innocua*, y 32 frente a *Enterococcus faecalis*.

4.3.3. Ensayo en pocillos

Con las cepas aisladas que dieron positivo en el ensayo en cruz 41, se tomó parte del sobrenadante una vez centrifugado y se utilizó para realizar el ensayo en pocillos.

En la figura 6 y tablas (36 y 37) se muestran los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana producida por las cepas aisladas frente a las bacterias indicadoras *Listeria innocua* y *Enterococcus faecalis*.

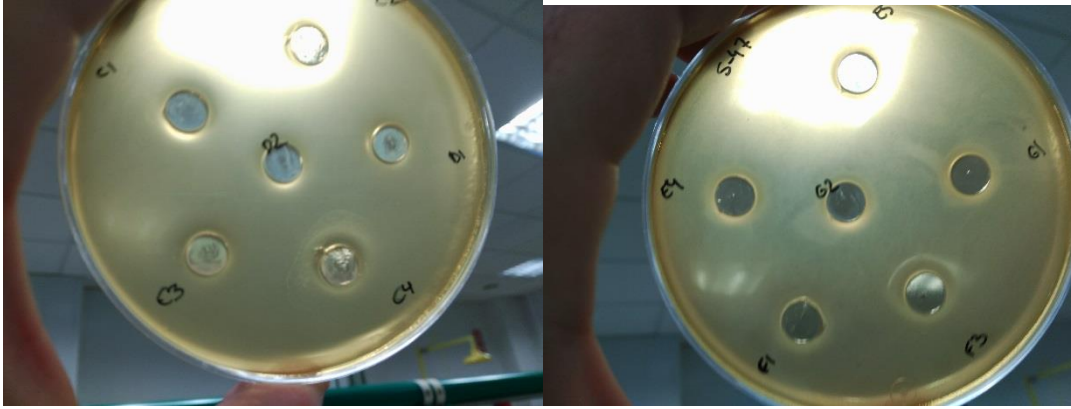


Figura 6. Resultado en el ensayo con pocillos

En todos los resultados obtenidos, los halos fueron similares, aproximadamente de 10 mm, por lo que se muestran a continuación las cepas que produjeron halo y frente a qué indicadora.

Listeria		
A2	D2	I3
B3	D5	K4
B4	E3	K5
C2	G2	L1
C3	I2	L2

Tabla 36. Resultado halo de inhibición frente a *Listeria innocua*

S-47		
A1	D2	H1
A3	D4	I2
B4	D5	I5
C1	E2	K3
C2	E5	K5
C3	G1	L2

Tabla 37. Resultado halo de inhibición frente a *Enterococcus faecalis*

Se aprecia un descenso muy importante en el número de cepas que han mostrado un halo representativo en el ensayo de pocillos, comparado con el anterior ensayo de gotas. Para mayor comprensión se muestra en la siguiente figura 7 la comparación entre los distintos ensayos.

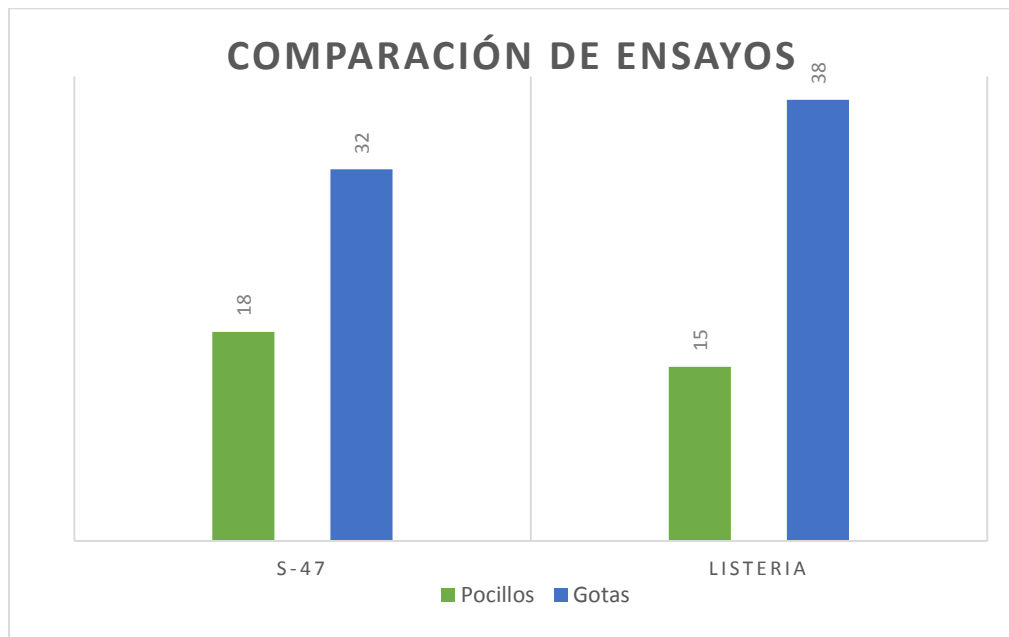


Figura 7. Comparación ensayos con pocillos y con gotas frente a *L. innocua* y *E. faecalis*.

La diferencia entre ambos ensayos es muy notable, tanto en el número de cepas que dieron positivo, como en el diámetro que mostraron en cada halo de inhibición, ya que en el ensayo de los pocillos, todos los diámetros fueron de 10 mm, mientras que en el ensayo de gotas fueron desde 9 mm hasta 20 mm, más del doble de lo obtenido en el otro ensayo.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos podido aislar bacterias lácticas de diferentes tipos de quesos, como han descrito otros autores la microbiota de los quesos es muy importante en las fases de formación de estos (Fernández, 2000) y dentro de esta microbiota juegan un papel muy importante las bacterias lácticas, que participan de las características organolépticas que le podemos atribuir los diferentes tipos de quesos (Keating y Rodríguez, 2002).

A parte de las bacterias presentes en la leche que va a dar lugar a la formación de los quesos, las bacterias lácticas también se utilizan como cultivos iniciadores en diferentes tipos de quesos de ahí que se hayan podido encontrar bacterias lácticas en todos los quesos que hemos ensayado.

En un estudio reciente de quesos frescos de cabra artesanales se han podido identificar y caracterizar bacterias lácticas (BAL) y levaduras nativas, aisladas de quesos frescos de esta zona productora. De cada una de las bacterias lácticas aisladas: *Lactocacillus delbruekii subsp. bulgaricus*, *Lb. casei subsp. pseudopiantarum*, *Lb. plantarum var. arabinosus*, *Lb. plantarum var. plantarum*, *Lb. casei subsp. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis var. brevis*, *Lactococos sp.* se ha podido determinar su participación en la coagulación (Olarte et al., 2000), su capacidad acidificante. , actividad lipolítica (Suzzi et al., 2001) y actividad proteolítica. (Ancasi et al., 2015).

Otra cuestión importante es la capacidad de conservación las bacterias lácticas aisladas de quesos o productos lácteos. En estudios anteriores se han podido identificar bacterias lácticas con propiedades antimicrobianas en diferentes tipos de quesos (Topisirovic et al., 2006), en nuestro trabajo también hemos podido identificar diferente cepas aisladas de quesos con propiedades antimicrobianas. Como han descrito otros autores la mayoría de las bacteriocinas se producen durante la fase exponencial de crecimiento y se ha observado que su cantidad en el medio de cultivo, es directamente dependiente de la cantidad de biomasa producida (De Vuyst y Vandamme, 1994), este quizás puede ser uno de los motivos por el cual nos han salido diferentes resultados en los distintos ensayos, como comenta el autor es más fácil detectar la producción de bacteriocinas en

un crecimiento sólido donde la biomasa es mayor que cuando se centrifuga y se ensaya solo el sobrenadante como es el caso del ensayo por pocillos.

Otra cuestión a tener en cuenta es la variación de algunas condiciones de cultivo, tales como la temperatura, tiempo de fermentación, aireación y pH, pueden tener efectos importantes en la producción de bacteriocinas. El desarrollo a temperaturas elevadas puede eliminar completamente la producción de bacteriocinas (Dajani y Taube, 1974), lo que conduce a veces a la pérdida irreversible de sus propiedades. Nosotros hemos trabajado en iguales condiciones y con un medio inicial, para poder identificar las cepas productoras se debería de encontrar el medio óptimo, el pH y las condiciones para cada una de las cepas de bacterias lácticas que hemos encontrado.

6. CONCLUSIÓN

Con los resultados obtenidos podemos deducir que:

1. Se ha podido detectar la presencia de bacterias lácticas en los siguientes quesos: Azul, Havarti, Tierno Mezcla (Oveja, Cabra, Vaca), Semicurado Mezcla, Semicurado Oveja, Fresco, Cabra, Maasdam, Gorgonzola, Emmental, Tierno Mezcla (Oveja).
2. El mayor número de bacterias lácticas se puede encontrar en queso Tierno Mezcla (Oveja, Cabra, Vaca), Semicurado Mezcla, Semicurado Oveja, Gorgonzola, Emmental, Tierno Mezcla (Oveja).
3. El ensayo más efectivo para la obtención de bacterias productoras de bacteriocinas en el ensayo en cruz.
4. En el ensayo en cruz, aparecen halos de inhibición frente a *Enterococcus faecalis*, y *Listeria innocua*, en todas las cepas ensayadas.

5. En el ensayo en gota, aparecen halos de inhibición frente a ambas bacterias indicadoras, pero el diámetro de los halos es superior frente a *Listeria innocua*.
6. En el ensayo en pocillos, aparecen halos de inhibición frente a *Listeria innocua* y *Enterococcus faecalis*, pero en general se obtienen menos halos que en el resto de ensayos.
7. Los quesos con una actividad antimicrobiana más elevada son el Semicurado Mezcla, Gorgonzola, Emmental y Tierno Mezcla (Oveja).

7. BIBLIOGRAFIA

- Axelsson L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Salminen y Von Wright. Marcel Dekker New York, pp. 1-60.
- Barakat, R. K., Griffiths, M. W y Harris, L.J. 2000. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* sp. From cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 83-94.
- Carr, F. L., Chill, D. y Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *C. Rev. in Microbiol.* 28(4):281-370
- Dajani y Wannamaker, (1969). Bacteriocins of gram-positive bacteria 36 40: 722–756.
- De Vuyst, L., and E. J. Vandamme. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom.
- E. Gustavo Ancasi, S Maldonado, R Oliszewski 2015 Evaluación de la diversidad de bacterias lácticas y levaduras en quesos frescos de cabra de la quebrada de Humahuaca. B. revista de la facultad de ciencias básicas. 13:1
- Fernández, E. E. 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. México, D.F.

- Frazier, W.C., Westthoff, D.C. 2000. *Microbiología de los Alimentos*. Editorial Acribia. 4ª Edición. Zaragoza España.
- Gil Martínez, A. 2006. *Preelaboración y conservación de alimentos*. Madrid: Akal.
- Hicks, C.L., Allauddin, M., Langlois, B. E. and O' Leary, J. 1982. Psychrotrophic bacteria reduce cheese yield. *J. Food Prot.* 45:331-334.
- Holck, Axelsson, Birkeland, Aukrust y Blom, 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sakei*Lb706. *J. of Gen. Microbiol.* 138: 2715-2720
- Jay, J.M. 1994. *Microbiología moderna de los alimentos*. Editorial Acribia. 4ª Edición. pp 441-475. Zaragoza, España.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., 1995. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*59 :171-200
- Joerger, M.C. and T.R. Klaenhammer. 1986. Characterization and purification of helveticin J: evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus-jugurt* 481. *J. Bacteriol.* 167:439-446. 31
- Keating, F.P., Rodríguez, G.H. 2002. *Introducción a la lactología*. Editorial Limusa. 2º Edición. México, D.F.
- Klaenhammer TR. 1993 Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:39-85.
- Marcos Balciunas, E., Castillo Martinez, F. A., Dimitrov, S. T., Gombossy de Melo Franco, B. D., & De Souza Oliveira, R. P. 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32, 134 - 142.
- Massa, S., F. Gardini, M. Sinigaglia, and M. E. Guerzoni. 1992. *Klebsiella pneumoniae* as a spoilage organism in Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 75: 1411-1414.
- McAuliffe O., R. Paul Ross, Colin Hill, 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action *FEMS Microbiology Reviews* 25: 285-308.

- Muriana, P.M. and T.R. Klaenhammer. 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:114-121.
- Navaratna, M.A.D.B., Sahl, H.G. and Tagg, J.R. 1998 Two-component anti-Staphylococcus aureus lantibiotic activity produced by Staphylococcus aureus C55. *App. and Environ. Microbiol.* 64. 4803-4808.
- Nickerson, S.C. 1985. Immune mechanisms of the bovine udder: an overview. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187:41-45.
- Olarte, C., Sanz, S., González-Fandos, E., Torre, P. The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat's cheese (Cameros cheese). *J. of App. Microbiol.* 2000; 88: 421–429.
- Rogers, L.A., Whittier, E.D. 1928. Limiting factors in lactic fermentation. *J. of Bacteriol.* 16, 210-229.
- Suzzi, G., Lanorte, M. T., Galgano, F., Andrighetta, C., Lombardi, A., Lanciotti, R. & Guerzoni, M. E. Proteolytic, lipolytic and molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *International J. of Food Microbiol.* 2001; 69: 69-77.
- Tagg, J.R. and A.R. McGiven and L.W. Wannamaker, 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria, *Bacteriol.* 40: 722–756.
- Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I. and Lozo, J. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. I. *J. of Food Microbiol.* 2006; 112: 230–235.
- Veisseyre, R. 1988. *Lactología Técnica. 2º Edición.* Editorial Acribia. Zaragoza España.