



**Universidad Central de  
Venezuela  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología**

**Evaluación de la Susceptibilidad Antibiótica de Bacterias  
Ácido Lácticas Aisladas de Productos Cárnicos  
Fermentados.**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la ilustre  
Universidad Central de Venezuela,  
por la bachiller Muñoz Rodríguez  
Analix como requisito parcial para  
optar al título de Licenciado en  
Biología.

**Tutora:** MSc. Palomino, Carolina

CARACAS, VENEZUELA

FEBRERO-2013

## RESUMEN

En la industria de los alimentos se emplean bacterias ácido lácticas como cultivos iniciadores para la elaboración de productos fermentados tales como yogurt, leches, mantequillas, quesos madurados, col agria, embutidos (salchichón y chorizo) y bebidas alcohólicas como cerveza, sidra, entre otros; donde producen cambios específicos en el aroma, sabor, textura, cuerpo, acidez, humedad, digestibilidad y aspecto de los mismos.

La actividad de microorganismos y enzimas modifica las materias originales y las convierten en nuevos productos nutritivos y sensorialmente muy aceptables, a la vez que origina sustancias conservadoras, tales como bacteriocinas o los ácidos lácticos y acético.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un vasto conjunto de microorganismos benignos, dotados de propiedades similares, que fabrican ácido láctico como producto final del proceso de fermentación.

La aparición de resistencia a antibióticos es un fenómeno natural que puede ser debido a la diseminación de los sistemas de defensa que presentan las cepas productoras, o a cambios en genes cuyas proteínas codificadas modifican su actividad hasta ser capaces de proteger o modificar el blanco de acción o de modificar los antibióticos.

La resistencia a antibióticos también presenta un peligro potencial cuando se encuentra en los microorganismos comensales o beneficiosos, ya que estos pudieran convertirse en reservorios desde dónde los determinantes podrían transferirse a los microorganismos oportunistas y a los patógenos.

En base a esto se realizó un trabajo experimental para analizar la susceptibilidad a distintos antibióticos, que presentan diferentes cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos cárnicos fermentados (salchichón y chorizo), obteniéndose los siguientes resultados:

Se aisló un total de 9 cepas de BAL; 6 pertenecientes a la especie *Pediococcus pentosaceus*, 2 a la especie *Lactobacillus brevis* y 1 cepa perteneciente a la especie *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum*.

Estas 9 cepas se ensayaron ante 12 antibióticos, presentando un 100% de susceptibilidad a los antibióticos amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina, amikacina, gentamicina, cloranfenicol y azitromicina. Para el antibiótico penicilina presentaron un 90% de susceptibilidad, y para la ceftazidima presentaron un 30% de susceptibilidad. Sin embargo, las cepas fueron resistentes en un 100% a la oxacilina, tetraciclina y metronidazol.

El estudio de la susceptibilidad permitió identificar al 100% de las cepas como multirresistentes, presentando un índice de multirresistencia (MAR) superior a 0,2.

En cuanto a la concentración mínima inhibitoria (CMI), se calculó por el método de difusión en pozo descrito por Paik y col. (1997), siendo 10 µg/mL la menor concentración a la cual fueron inhibidas las cepas y 1000 µg/mL la mayor concentración de inhibición.

Al realizar los análisis estadísticos se encontró que el 92% de los halos de inhibición de las cepas, comparadas con la cepa control por antibiótico presentaron una probabilidad menor a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ) indicando que existe diferencias significativas entre los datos.

Para el análisis de comparación entre cepas y entre especies, se obtuvo una probabilidad mayor a 0,05 ( $p \geq 0,05$ ), indicando que no existe diferencias significativas en los halos de inhibición de las cepas entre sí.

Este estudio nos permitió evaluar la susceptibilidad de las BAL frente a diferentes antibióticos, permitiendo obtener la multiresistencia y el tipo de resistencia presentada por las cepas, de manera de saber si dicha resistencia puede ser transmitida a otros microorganismos, en el caso de que la resistencia sea adquirida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a Dios primeramente por ser mi dador de vida, mi salvador y mi guía en todo el proceso de mi vida, permitiéndome llegar a donde estoy ahorita.

A mi madre, Ana Rodríguez por ser una persona incondicional, por estar conmigo en el trayecto de mi vida y darme todas las herramientas, consejos y el amor necesario para enfrentar al mundo. Por todos sus sacrificios para darme todas las cosas que solo una madre puede dar.

A mi esposo Elvis Josué Padrón, por estar conmigo en las buenas y en las malas y apoyarme en los momentos más difíciles.

A toda mi familia (mi papa, hermanos, tías y primos) por enseñarme lo que es compartir, estar juntos, y el apoyo incondicional.

A mi tutora Carolina Palomino, por enseñarme todas las herramientas para la realización de este trabajo, por su paciencia y dedicación y por estar siempre que la necesitaba.

A mi amiga Kerly Ramírez, porque juntas estuvimos en todo el proceso de la carrera. Juntas reímos, lloramos, nos caímos y levantamos. Juntas transcurrimos por el hermoso camino que nos dio la mejor universidad (UCV).

A la Universidad Central de Venezuela, por brindarme una educación de excelencia, porque puedo decir que me siento ORGULLOSA DE SER UCVISTA.

A mis compañeras Diomarina Vivas y Carolina Uzcátegui por toda su colaboración y apoyo cuando las necesitaba.

A todas las personas que contribuyeron con este trabajo: a la Licenciada Indira Pérez por su colaboración en la identificación de las cepas a través del programa informático para API 50 CHL, a la directora adjunta Juana Vitelli de Flores y a la empresa Ganbaro por sus donativos en los suministros para el trabajo.

Y finalmente agradezco a todas las personas que de alguna u otra forma estuvieron en todo el transcurso de mi carrera.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>17</b>
2.1 Uso de los microorganismos en los alimentos.....	17
2.2 Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	18
2.2.1 Metabolismo de los carbohidratos.....	19
2.2.2 Tipos y géneros principales.....	22
2.2.3 Hábitat de las BAL.....	26
2.2.4 Cultivos iniciadores.....	27
2.2.5 Las bacterias ácido lácticas y los productos cárnicos.....	27
2.3 Productos fermentados.....	28
2.3.1 Salchichón.....	29
2.3.2 Chorizo.....	29
2.4 Los antibióticos. ....	30
2.4.1 Clasificación de los antibióticos.....	30
2.4.2 Resistencia a los antibióticos.....	31
2.4.3 Resistencia a los antibióticos en bacterias ácido lácticas.....	33
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 Objetivo general.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>

4.1 Lugar de trabajo.....	38
4.2 Materiales y Equipos.....	38
4.3 Muestreo.....	40
4.4 Método.....	40
4.4.1 Aislamiento de los microorganismos.....	40
4.4.2 Identificación de los microorganismos.....	41
4.4.3 Susceptibilidad de las bacterias ácido lácticas a antibióticos.....	44
4.4.4 Análisis de la multirresistencia.....	45
4.4.5 Detección de la concentración mínima inhibitoria de cada antibiótico (CMI).....	45
4.4.6 Análisis de los resultados.....	47
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
5.1 Aislamiento e identificación de las cepas de bacterias ácido lácticas.....	49
5.2 Evaluación de la susceptibilidad de las BAL.....	53
5.3 Análisis de multirresistencia.....	66
5.4 Detección de la concentración mínima inhibitoria.....	68
5.5 Análisis de resultados.....	79
<b>6. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>83</b>
<b>7. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>85</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>86</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>93</b>
9.1 Diluciones realizadas para obtener concentraciones de 1000, 100, 10 y 1µg/mL. de cada antibiótico para realizar la prueba de concentración mínima inhibitoria.....	93

9.2 CMI de cada cepa para los antibióticos que causaron la clasificación de sensible e intermedio.....	98
9.3 Diámetro de los halos de inhibición por cada concentración para la detección de la CMI por cepa.....	107

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.....	21
<b>Figura 2:</b> Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.....	21
<b>Figura 3:</b> Aislamiento de bacterias ácido láctica mediante siembra en doble capa con agar MRS.....	41
<b>Figura 4:</b> Esquema de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias ácido lácticas.....	42
<b>Figura 5:</b> Aplicación de la prueba API 50-CHL.....	43
<b>Figura 6:</b> Esquema para evaluar la susceptibilidad a los antibióticos.....	45
<b>Figura 7:</b> Esquema para detectar la concentración mínima inhibitoria.....	47
<b>Figura 8:</b> Colonias características de bacterias ácido lácticas.....	51
<b>Figura 9:</b> Porcentaje de identificación de las BAL.....	52
<b>Figura 10:</b> Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico amoxicilina/ácido clavurónico.....	68
<b>Figura 11:</b> Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico ampicilina.....	70
<b>Figura 12:</b> Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico penicilina.....	71
<b>Figura 13:</b> Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico ceftazidima.....	72
<b>Figura 14:</b> Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico amikacina.....	73

<b>Figura 15:</b> Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico gentamicina.....	74
<b>Figura 16:</b> Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico ciprofloxacina.....	75
<b>Figura 17:</b> Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico cloranfenicol.....	76
<b>Figura 18:</b> Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico azitromicina.....	77
<b>Figura 19:</b> Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico amoxicilina/ ácido clavurónico con una concentración inicial de (400 + 57) mg/5mL.....	93
<b>Figura 20:</b> Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico ampicilina con una concentración inicial de 250 mg/5mL.....	93
<b>Figura 21:</b> Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico penicilina con una concentración inicial de 500 mg/2 mL.....	94
<b>Figura 22:</b> Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico ceftazidima con una concentración inicial de 1000 mg/5 mL.....	94
<b>Figura 23:</b> Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico amikacina con una concentración inicial de 500 mg/2 mL.....	95
<b>Figura 24:</b> Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico gentamicina con una concentración inicial de 20 mg/2 mL.....	95
<b>Figura 25:</b> Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico ciprofloxacina con una concentración inicial de 200 mg/100 mL.....	96
<b>Figura 26:</b> Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico cloranfenicol con una concentración inicial de 2500 µg/ mL.....	96

<b>Figura 27:</b> Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico azitromicina con una concentración inicial de 200 mg/5mL.....	97
<b>Figura 28:</b> CMI de todas las cepas para el antibiótico amoxicilina/ácido clavurónico.....	98
<b>Figura 29:</b> CMI de todas las cepas para el antibiótico ampicilina.....	99
<b>Figura 30:</b> CMI de todas las cepas para el antibiótico penicilina.....	100
<b>Figura 31:</b> CMI de todas las cepas para el antibiótico ceftazidima.....	101
<b>Figura 32:</b> CMI de todas las cepas para el antibiótico amikacina.....	102
<b>Figura 33:</b> CMI de todas las cepas para el antibiótico gentamicina.....	103
<b>Figura 34:</b> CMI de todas las cepas para el antibiótico ciprofloxacina.....	104
<b>Figura 35:</b> CMI de todas las cepas para el antibiótico cloranfenicol.....	105
<b>Figura 36:</b> CMI de todas las cepas para el antibiótico azitromicina.....	106

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Títulos obtenidos en las 20 de muestras de salchichón.....	49
<b>Tabla 2:</b> Títulos obtenidos en las 20 de muestras de chorizo.....	50
<b>Tabla 3:</b> Cepas utilizadas para el estudio de este trabajo.....	52
<b>Tabla 4:</b> Porcentaje de susceptibilidad antibiótica.....	54
<b>Tabla 5:</b> Longitud de los halos de inhibición para la amoxicilina/ácido clavurónico.....	55
<b>Tabla 6:</b> Longitud de los halos de inhibición para la ampicilina.....	55
<b>Tabla 7:</b> Longitud de los halos de inhibición para la penicilina.....	56
<b>Tabla 8:</b> Longitud de los halos de inhibición para la oxacilina.....	58
<b>Tabla 9:</b> Longitud de los halos de inhibición para la ceftazidima.....	58
<b>Tabla 10:</b> Longitud de los halos de inhibición para la amikacina.....	59
<b>Tabla 11:</b> Longitud de los halos de inhibición para la gentamicina.....	60
<b>Tabla 12:</b> Longitud de los halos de inhibición para la tetraciclina.....	61
<b>Tabla 13:</b> Longitud de los halos de inhibición para la ciprofloxacina.....	62
<b>Tabla 14:</b> Longitud de los halos de inhibición para el cloranfenicol.....	63
<b>Tabla 15:</b> Longitud de los halos de inhibición para la azitromicina.....	64
<b>Tabla 16:</b> Longitud de los halos de inhibición para el metronidazol.....	65
<b>Tabla 17:</b> Índice de multirresistencia para cada cepa.....	66
<b>Tabla 18:</b> CMI de cada antibiótico en las 9 cepas.....	78

<b>Tabla 19:</b> probabilidad obtenida por antibiótico de las cepas con respecto a la cepa control.....	80
<b>Tabla 20:</b> Diámetro de inhibición de las 6 cepas de <i>Pediococcus pentosaceus</i> con su respectiva probabilidad.....	81
<b>Tabla 21:</b> Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa control...	106
<b>Tabla 22:</b> Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 1.....	106
<b>Tabla 23:</b> Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 2.....	106
<b>Tabla 24:</b> Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 3.....	107
<b>Tabla 25:</b> Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 4.....	107
<b>Tabla 26:</b> Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 5.....	107
<b>Tabla 27:</b> Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 6.....	108
<b>Tabla 28:</b> Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 7.....	108
<b>Tabla 29:</b> Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 8.....	108
<b>Tabla 30:</b> Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 9.....	109

## 1. INTRODUCCIÓN

En la industria de los alimentos se emplean bacterias como cultivos iniciadores para la elaboración de productos fermentados tales como yogurt, leches, mantequillas, quesos madurados, col agria, embutidos (salchichón y chorizo) y bebidas alcohólicas como cerveza, sidra, entre otros; donde producen cambios específicos en el aroma, sabor, textura, cuerpo, acidez, humedad, digestibilidad y aspecto de los mismos (Mora y García, 2007).

Entre las bacterias que se utilizan como cultivos iniciadores se encuentran las bacterias ácido lácticas. Estas bacterias son organismos inmóviles, de forma bacilar o esférica, unidos por un conjunto de propiedades metabólicas y nutricionales poco corrientes. Su nombre deriva del hecho de que sintetizan ATP a través de fermentaciones de carbohidratos que dan ácido láctico como principal producto final (Stanier y col., 1992).

La aplicación de bacterias ácido lácticas (BAL) tiene dos objetivos en los alimentos fermentados. Primero, desarrollar sabores y olores característicos durante la fermentación y segundo, inhibir la microflora competitiva mediante la reducción del pH del medio. De este modo, las BAL tienen un papel muy importante en la conservación de alimentos fermentados provocando cambios en olores, sabores y textura, además de su mencionada acción preservativa (León y col., 2006).

Es conocido que las bacterias ácido lácticas no sólo son interesantes en la industria alimentaria por inducir características organolépticas y estructurales deseables, sino también por inhibir el desarrollo de microorganismos no deseables, alterantes y patógenos, lo que sugiere la posibilidad de utilizarlas para

extender la vida útil e incrementar la calidad higiénica de los alimentos (Hernández y col., 1993).

Todas las bacterias del ácido láctico fermentan diversos azúcares, produciendo ácido láctico en cantidades suficientemente elevadas como para inhibir o matar a la mayoría de los otros microorganismos. Pero, con unas pocas excepciones, que incluyen algunos estreptococos, las bacterias ácido lácticas son inocuas para la especie humana y, además, sus productos metabólicos tienen un sabor agradable. Estas propiedades permite utilizar las bacterias ácido lácticas para preparar y conservar alimentos (Ingraham, 1998).

Las bacterias pueden presentar una resistencia intrínseca o natural a determinados antibióticos o pueden adquirir dicha resistencia por medio de mutaciones o mediante la adquisición de material genético que aporte nuevas funcionalidades bioquímicas (Flórez, 2007).

La resistencia a antibióticos también presenta un peligro potencial cuando se encuentra en los microorganismos comensales o beneficiosos, ya que estos pudieran convertirse en reservorios desde dónde los determinantes podrían transferirse a los microorganismos oportunistas y a los patógenos (Flórez, 2007).

Por esta razón el trabajo experimental consistió en analizar la susceptibilidad de las bacterias ácido lácticas ante diversos antibióticos, aisladas de productos cárnicos fermentados como el salchichón y el chorizo.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Uso de los microorganismos en los alimentos.**

Al desarrollarse la ciencia de la Microbiología se conocieron las actividades de los microorganismos en diferentes productos, por ejemplo la fermentación bacteriana es una forma útil en la preservación de alimentos, así como un medio para crear nuevos sabores y olores agradables en los alimentos (Olivas y Alarcón, 2001).

La actividad de microorganismos y enzimas modifica las materias originales y las convierten en nuevos productos nutritivos y sensorialmente muy aceptables, a la vez que origina sustancias conservadoras, tales como bacteriocinas o los ácidos lácticos y acético. De este modo, desempeñan un importante papel en las dietas propias de los diversos hábitos alimenticios mundiales, al proporcionarles la posibilidad de ofrecer cierta variedad (Bello, 2005).

La primera aplicación de los microorganismos por el ser humano fue probablemente su utilización para la obtención y conservación de alimentos y bebidas. En este sentido las bacterias del ácido láctico han desempeñado papeles fundamentales (Ingraham, 1998).

Las bacterias lácticas se han utilizado en la obtención y producción de la mayor parte de los alimentos fermentados que actualmente se consumen, entre los que se incluyen yogurt, quesos, embutidos crudos curados, encurtidos y otros (Hernández y col., 1993).

El desarrollo de las bacterias ácido lácticas en los alimentos propicia un acentuado ambiente hostil para el crecimiento y sobrevivencia de otras bacterias, principalmente las patógenas. Los efectos inhibitorios y destructivos no sólo son el

resultado de una acidificación del medio, si no que intervienen otros mecanismos, entre ellos la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), antibióticos, ácido grasos, bacteriocinas y agotamiento de nutrientes, lo que provoca un aumento en la vida de anaquel de los productos (Ortiz, 2006).

## **2.2 Bacterias Ácido Lácticas (BAL).**

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son un grupo taxonómicamente diverso de bacterias Gram-positivas, anaerobias estrictas o aerotolerantes, generalmente inmóviles, no esporuladas ni pigmentadas, con la facultad de convertir los carbohidratos en ácido láctico, provocando la acidificación del medio. Además, tienen una limitada capacidad biosintética, por lo que son muy exigentes nutricionalmente y requieren numerosos factores de crecimiento, incluyendo aminoácidos, vitaminas y precursores de los ácidos nucleicos (Flórez, 2007).

Aún creciendo en medios muy ricos, las colonias de las BAL siempre son relativamente pequeñas. Casi nunca están pigmentadas; como resultado de la ausencia de citocromo la colonia tiene un aspecto blanco muy característico. El pequeño tamaño de las colonias de estas bacterias es atribuible, en primer lugar, a los bajos rendimientos del crecimiento, consecuencia de su metabolismo exclusivamente fermentativo (Stanier y col., 1992).

La mayoría de las BAL son mesófilicas, aunque algunas son capaces de crecer a temperaturas de  $5^{\circ}C$  y otras a  $45^{\circ}C$ . Toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajo que el resto de las bacterias (algunas pueden crecer a pH 3, otras entre 6 y 9, pero la mayoría crece a un pH entre 4 y 4,5) por lo que pueden desplazarlas de los hábitats que colonizan (Jay, 2002).

La capacidad fermentativa varía de acuerdo con las especies. La mayor parte de las bacterias ácido lácticas forman entre un 0,5 y un 1,5% de ácido láctico, pero hay especies que pueden formar hasta una 3% (Geosta y López, 2001).

Estas forman parte de la microbiota natural de muchos alimentos y no existe ninguna indicación de que representen un riesgo para la salud del consumidor, por lo tanto las BAL como algunos de sus metabolitos son considerados como GRAS (Generalmente Reconocidas como Seguras) por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) de EEUU (Mora y García, 2007).

El empleo de las BAL tiene como propósito el que realicen las siguientes funciones en proporciones variables (Hernández, 1988):

- a) Diseminación del pH a determinada velocidad dentro de ciertos límites.
- b) Acción sustitutoria frente a patógenos nativos y patógenos que reinfectan los alimentos.
- c) Efecto generador de aroma como consecuencia del metabolismo bacteriano en el producto.
- d) Producción de enzimas que causan fenómenos catalíticos y/o hidrolíticos en la materia prima.

### **2.2.1 Metabolismo de los carbohidratos.**

Las bacterias ácido lácticas obtienen energía metabólica esencialmente mediante la fosforilación a nivel de sustrato, durante la oxidación de carbohidratos, formando ácido láctico como principal metabolito. Además, poseen actividad proteolítica, lo que les permite la obtención de aminoácidos a partir de

proteínas, en medios ricos constituyentes; aunque ésta es reconocidamente inferior a otros grupos microbianos (Collado, 2004).

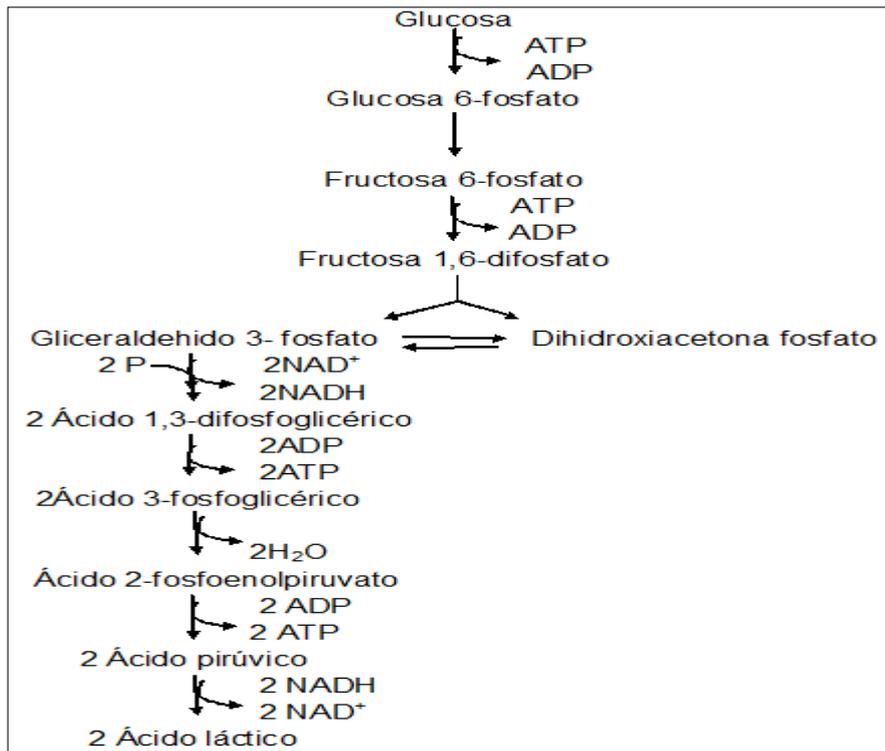
Las BAL pueden ser consideradas como homo o heterofermentativas, dependiendo de cómo fermenten los azúcares (hexosas y pentosas) en condiciones de crecimiento no limitadas (Mora y García, 2007).

Las BAL homofermentativas usan la glucólisis vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), resultando el ácido láctico como el producto final (Figura 1). Estas bacterias poseen las enzimas aldosas y hexosas, pero carecen de la fosfoacetolasa (A.A.P.P.A., 2004).

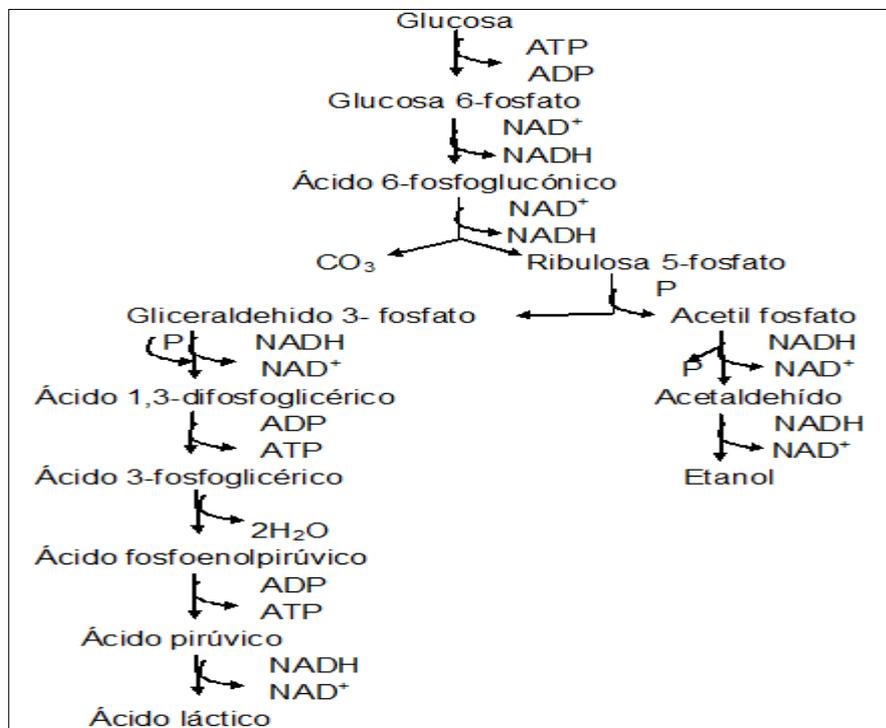
Dentro de este grupo se tiene: *Lactobacillus* de bastones largos, aisladas o en cadenas cortas, termófilos, acidificantes muy energéticos y de actividad caseolítica notable. *Streptococcus*, de forma esférica en cadenas, acidificación rápida y poca actividad caseolítica (Parra, 2010).

Las BAL heterofermentativas usan la vía 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa (6-PG/PK) o de las pentosas fosfato produciendo cantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y etanol (o ácido acético) como productos principales (Figura 2) (Mora y García, 2007).

Las especies heterofermentativas son incapaces de poseer la fructosa difosfato, por consiguiente la fructosa-difosfato-aldosa está ausente o reprimida (Ortiz, 2006).



**Figura 1:** Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Adaptada de Stanier y col., 1992).



**Figura 2:** Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Adaptada de Stanier y col., 1992).

Una de las principales diferencias entre las dos rutas está en sus rendimientos netos de ATP; dos moles por molécula de glucosa fermentada en la ruta homofermentativa y sólo un mol a través de la ruta heterofermentativa (Stanier y col., 1992).

Según Jay, 2002, en base a estas dos vías de fermentación, las BAL se dividen en:

- ★ Homofermentativas estrictas: sólo pueden fermentar hexosas por glucólisis.
- ★ Heterofermentativas estrictas: usan solamente la vía 6-PG/PK.
- ★ Heterofermentativas facultativas: tienen la capacidad de utilizar ambas vías, siendo homofermentativo su metabolismo principal.

### **2.2.2 Tipos y géneros principales.**

Las BAL poseen características ecológicas y metabólicas de importancia económica y tecnológica en los alimentos. Su clasificación se basa en la morfología, la forma de fermentar la glucosa, su desarrollo a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad de crecer a altas concentraciones de sal, tolerancia a la alcalinidad y acidez (Mora y García, 2007).

En la actualidad, el grupo de las BAL está conformadas por cocos, cocobacilos o bacilos Gram positivos, generalmente inmóviles y no esporulados, catalasa y oxidasa negativas, obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares produciendo ácido láctico como producto principal o único de su metabolismo, carecen de sistema de transporte de electrones funcionales ligados al heme o de citocromos y obtienen su energía por fosforilación a nivel de sustrato a la vez que oxidan carbohidratos; no tienen un ciclo de krebs funcional (Stanier y col., 1992).

En la naturaleza existen los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus thermophilus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Ramírez y col., 2011).

Sin embargo, las BAL más representativas se encuadran en los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y la especie *Streptococcus thermophilus*. Y por encontrarse en los mismos hábitats y tener una aplicación industrial similar, dentro de este grupo se han incluido tradicionalmente los géneros *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* (Flórez, 2007).

**Lactococcus**: Son cocos no esporulados, inmóviles, crecen a 10°C pero no a 45°C, se encuentran en parejas o cadenas cortas, catalasa negativos, anaerobios facultativos, homofermentadores y con necesidades nutricionales complejas. La longitud de la cadena depende principalmente de la cepa y en ocasiones por el medio de crecimiento (Jay, 2002).

Son bacterias que producen ácido láctico de tipo L(+). El género *Lactococcus* incluye las especies: *Lactococcus lactis* (con tres subespecies *lactis*, *cremoris* y *hordniae*), *Lc. garviae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum* y *Lc. raffinolactis* (Flórez, 2007).

**Lactobacillus**: Son bacilos largos con morfología cocobacilar y corineforme. Es frecuente la formación de cadenas. Son Gram-positivos, inmóviles, aunque existen unas pocas especies móviles por flagelos peritricos. No son esporulados. Son sacarolíticos obligados. Su característica principal es la de fermentar azúcares con producción de ácido láctico, pudiendo ser homofermentadores u heterofermentadores (Flórez, 2007).

Los *Lactobacillus* se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, carnes y pescados. Forman parte de la flora normal de la boca, tracto intestinal y aparato reproductor femenino humano y de muchos animales. No son considerados patógenos (excepto algunas especies que parecen intervenir en las caries dentales). Tienen una gran importancia industrial, pues se utilizan en diversos procesos de fermentación láctica (yogurt y queso). Intervienen también en la fabricación de productos derivados de los vegetales (pepinillos, aceituna) (Collado, 2004).

**Leuconostoc**: Los *leuconostoc* son bacterias lácticas heterofermentadoras obligadas que producen ácido láctico de tipo D(-) y cantidades equimoleculares de CO<sub>2</sub>, etanol y ácido acético. Se agrupan en cadenas como los lactococos, aunque se diferencian de éstos por la producción de gas y la incapacidad de hidrolizar la arginina (Flórez, 2007).

Pueden aislarse de plantas, ensilados y leche. Muy utilizados en la industria láctea (en la manufactura del suero de la leche, mantequilla y queso) como cultivos iniciadores, ya que producen compuestos responsables del sabor como diacetilo o acetoína (productos de la ruptura metabólica del citrato), en la fermentación de verduras como los coles (chucrut) y pepinillos en vinagre (Mora y García, 2007).

**Pediococcus**: Los *pediococos* son bacterias Gram-positivas, anaerobias o aerotolerantes que se agrupan en tétradas y que poseen un metabolismo homofermentativo por el que transforman los carbohidratos en DL-lactato. El género está constituido por ocho especies de las que sólo dos, *Pediococcus acidilactici* y *P. pentosaceus*, se aíslan de quesos y productos cárnicos

fermentados, en los que también se utilizan como cultivos iniciadores (Flórez, 2007).

Se emplean como cultivo iniciador de salchichas semisecas, pueden ser deterioradores de sidra y cerveza realizando una infección que la enturbia y acidifica con un olor peculiar denominado “enfermedad de la cerveza por sarcinas”. Algunas cepas son productoras de bacteriocinas (Mora y García 2007).

**Streptococcus thermophilus**: Su nombre procede del término griego “therme” que significa calor y del término “philus” que significa afinidad. Son células esféricas u ovoides de 0,7-0,9  $\mu\text{m}$  de diámetro, distribuidas en parejas o formando cadenas. Son anaerobios facultativos, quimioorganotrofos con metabolismo fermentativo. Son catalasa negativos. Crece con un 2,5% de cloruro sódico pero no con un 4% (Collado, 2004).

Esta especie homofermentadora está emparentada con la bacteria comensal de la boca *Streptococcus salivarius*. Se utiliza junto con *Lb. delbrueckii* en la fermentación del yogurt y es un componente habitual de los fermentos de los quesos de pasta cocida junto a otras especies de *Lactobacillus* (Flórez, 2007).

**Propionibacterium**: Son bacterias Gram-positivas, inmóviles, no formadoras de esporas y quimioorganotrofas. Los productos de la fermentación de las propionibacterias incluyen grandes cantidades de ácido propiónico y acético y cantidades menores de ácido *iso*-valérico, fórmico, succínico y láctico. Producen también una pequeña cantidad de  $\text{CO}_2$ , responsable de la formación de ojos en el queso (Flórez, 2007).

**Bifidobacterium**: La morfología de la familia consiste en bacilos pleomórficos que se presentan individualmente, en cadenas o en grupos. Las células no tienen cápsula y no forman esporas, no son móviles ni presentan

filamentos. Todas las especies son Gram positivas a excepción de *G. vaginalis* que presenta un Gram variable. Son anaerobios, algunas especies de *Bifidobacterium* pueden tolerar el oxígeno únicamente en presencia de CO<sub>2</sub>, y *Gardnerella* es anaerobia facultativa. No utilizan el indol, no hidrolizan la gelatina, catalasa y oxidasa negativas (Collado, 2004).

Su nombre hace referencia a las formas con dos ramas en Y o V que muestran en ocasiones. El género está compuesto por 29 especies, de las que unas 12 se aíslan del tracto gastrointestinal humano y el resto proceden de ambientes tan diversos como alimentos, cavidad oral, tracto gastrointestinal animal, intestino de insectos y aguas residuales (Flórez, 2007).

### **2.2.3 Hábitat de las BAL.**

Las BAL son muy exigentes en su nutrición al requerir una gran cantidad de factores nutritivos (aminoácidos, bases nitrogenadas, algunas vitaminas principales del grupo B y fuentes de carbono). La mayor parte de las BAL obtienen energía sólo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables, por lo cual su desarrollo está restringido a ambientes ricos en azúcares (Mora y García, 2007).

Las BAL tienen numerosos hábitats. A parte de los productos lácteos, se le encuentra abundantemente en los productos vegetales: ensilados, chucrut, granos, jugos y mosto en fermentaciones. También están presentes en los tubos digestivos del hombre y de los animales y en las cavidades naturales (boca, vagina). Sin embargo, muchas especies individuales están adaptadas a un ambiente específico y no se encuentra habitualmente, fuera de él. La factibilidad con que estas bacterias pueden aislarse en materiales de la misma naturaleza demuestra que se trata de su hábitat natural (Alais, 2003).

#### **2.2.4 Cultivos iniciadores.**

La aplicación de los cultivos bacterianos iniciadores tiene aproximadamente un siglo. La industria láctea empezó con el uso de éstos y aún se mantiene a la vanguardia en la tecnología de cultivos iniciadores (A.A.P.P.A. 2004).

Los cultivos iniciadores son preparaciones que contienen microorganismos vivos y se aplica con la atención de aprovechar sus metabolismos (A.A.P.P.A. 2004).

Las preparaciones usadas como cultivos iniciadores se pueden clasificar atendiendo a múltiples aspectos tecnológicos como velocidad de acidificación, proteólisis, composición y temperatura óptima de crecimiento (Mora y García, 2007).

Entre los microorganismos que se utilizan como cultivos iniciadores se encuentran las bacterias ácido lácticas, las cuales imparten características sensoriales deseables y una buena capacidad de conservación en los alimentos fermentados (Flores, 2007).

#### **2.2.5 Las bacterias ácido lácticas y los productos cárnicos.**

La flora espontánea predominante de la fermentación de los productos cárnicos está constituida por lactobacilos. En 1940, *Lb. Plantarum*, *Lb. Brevis* y *Lb. Fermentum* fueron propuestos en los Estados Unidos para la fabricación de salchichones, pero las dificultades para liofilizar de estas especies hizo que se cambiara a favor de los *Pediococcus*, primer cultivo iniciador comercial disponible para los productos cárnicos (Ortiz, 2006).

En 1974 se desarrolló un cultivo iniciador concentrado congelado formado por *Lb. Plantarum* sólo o en cultivo mixto en asociación con otras BAL como *Pediococcus acidilactis* (Bacus y Brown, 1985).

Según Gibbs (1987) los *Pediococcus* y *Lactobacillus* utilizados inhiben a las salmonelas, los estafilococos o a *Clostridium botulinum* durante la fabricación de salchichas y tocino. La adición de diversas bacterias lácticas a la carne fresca permite una mejor conservación.

### **2.3 Productos fermentados.**

Desde el punto de vista industrial un proceso de fermentación es un conjunto de reacciones químicas realizadas por microorganismos vivos bajo condiciones fisicoquímicas determinadas en un entorno físico denominado reactor o fermentador, para obtener productos de interés socioeconómico (Moya, 1995).

La fermentación comienza con la adición de sal a la materia prima, variando la concentración de ésta en función del producto que se trate, aunque suele ser del 6% o mayor. En el proceso de fermentación intervienen diversas especies microbianas, que pueden haber sido inoculadas o formar parte de la flora autóctona. Como resultado de la producción del ácido láctico el pH desciende, la flora se reduce a algunas especies acidotolerantes y el producto adquiere su textura y sabor ácido característico (Rodríguez, 2008).

A diferencia de la elaboración de los productos lácteos, en el caso de los productos cárnicos no se puede eliminar la flora asociada a la carne por métodos tradicionales (por ejemplo, tratamiento térmico) sin alterar sus características organolépticas. Por lo tanto, si se desea fabricar un embutido fermentado, es necesario llevar a cabo las operaciones de matanza y corte del animal con un estricto control de higiene. De esta manera, se evita al máximo una alta carga inicial de microorganismos. Los embutidos fermentados pueden generarse con la ayuda de cultivos iniciadores o bien con los microorganismos presente en la flora asociada (Hernández, 2003).

La elaboración de los productos cárnicos fermentados no es un proceso único, pues depende del tipo de producto que se quiera fabricar. En el caso de los embutidos como el salchichón y el chorizo, una vez mezclados todos los ingredientes, la pasta se amasa bien para eliminar el aire que pueda estar incluido y se coloca en una maquina embutidora y se procede a embutir en tripas naturales o artificiales (Hernández, 2003).

Una vez obtenido el embutido se procede a realizar la fermentación, colgando los productos en soportes especiales y se colocan en cámaras que tienen la temperatura y la humedad controlada. En estos cuartos se llevan a cabo la fermentación y en muchos casos, también el ahumado, lo que facilita el proceso tanto desde el punto de vista tecnológico como económico (Hernández, 2003).

Los productos cárnicos fermentados que se utilizaron en este trabajo fueron salchichón y chorizo.

### **2.3.1 Salchichón.**

Según norma COVENIN 1410-2000 el salchichón es el producto elaborado a base de carne de porcino, bovino o la mezcla de ambas, molida y/o picada, adicionado de tocino, sales de curado, especias, condimentos y otros ingredientes aprobados por la autoridad sanitaria competente, con la adición o no de cultivos iniciadores, embutido en tripas naturales o artificiales, el cual se somete a un proceso de maduración y desecación con o sin ahumado.

### **2.3.2 Chorizo.**

Según norma COVENIN 2700-2001 el chorizo seco es el producto elaborado a base de carne de porcino, bovino o la mezcla de ambas, molido y/o picada, adicionado de tocino y/o grasa de cerdo, sales de curado, pimentón y otras especias, condimentos e ingredientes aprobados por la autoridad sanitaria

competente, con la adición o no de cultivos iniciadores, embutidos en tripas naturales o artificiales, el cual se somete a un proceso de maduración y desecación con o sin ahumado.

## **2.4 Los antibióticos.**

El término antibióticos cuyo origen viene del griego anti “contra” y bios “vida” fue propuesto para definir sustancias dotadas de actividad antimicrobiana y extraídas de estructuras orgánicas vivientes, ya fueren bacterias, hongos o algas, con capacidad para anular la vida de diversos microorganismos (Mora y García, 2007).

La era de los antibióticos comienza en realidad en los años 30 con la introducción de las sulfonamidas y se continúa con la aplicación de la penicilina en los años 40. Al éxito clínico e industrial de este último antibiótico siguió una búsqueda intensiva de nuevos compuestos. Así pues, durante los años 40 y hasta comienzos de los 70, el desarrollo y la producción de nuevos antibióticos se incrementó de forma exponencial (Flórez, 2007).

La mayoría de los antibióticos alteran la síntesis de la pared bacteriana e interfieren en la síntesis proteica; otros producen alteraciones en la permeabilidad de la membrana bacteriana. Hay fármacos antibacterianos que causan difusión de la pared celular por inhibición de la síntesis de peptidoglucanos o por alteración de la barrera osmótica a los antibióticos, mientras que otros fármacos provocan la inhibición de la síntesis de ácido nucleico (Garg y col., 2007).

### **2.4.1 Clasificación de los antibióticos.**

Los antibióticos se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios, pero uno de los más utilizados es su mecanismo de acción, según el cual se pueden clasificar en los siguientes grupos (De Ahumada y col., 2002):

a) Inhibidores de la síntesis de la pared celular: Los antibióticos de este grupo actúan interfiriendo con diversos pasos de la biosíntesis del peptidoglicano de la pared celular, bien intracelularmente como la fosfomicina y la D-cicloserina, o bien extracelularmente como ocurre con los  $\beta$ -lactámicos que interaccionan con las proteínas encargadas del ensamblaje del polímero. En último término siempre se provoca la lisis celular.

b) Inhibidores de la síntesis proteica: El blanco molecular de acción de estos antibióticos son los ribosomas. La unión al ribosoma ocasiona una parada en la traducción, inhibiéndose, en consecuencia, la síntesis proteica. La interferencia puede producirse con la subunidad ribosómica 30S (aminoglicósidos y tetraciclinas) o con la subunidad 50S (cloranfenicol, macrólidos, lincosamidas y oxazolidinonas).

c) Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos: Los antibióticos de esta clase inhiben alguno de los componentes esenciales que participan en la síntesis de los ácidos nucleicos. Así, las quinolonas actúan inhibiendo la acción de las topoisomerasas II y IV, encargadas de controlar el superenrollamiento y desenrollamiento del ADN. La rifampina, por su parte, inhibe a la ARN polimerasa, impidiendo la formación de nuevo ARN.

d) Antibióticos que afectan a la membrana: Los antibióticos de este grupo afectan a la organización estructural de la membrana, desorganizándola o aumentando su permeabilidad. Como antibiótico característico de este grupo se puede citar a la polimixina E o colistina.

#### **2.4.2 Resistencia a los antibióticos.**

Durante las últimas décadas, el uso excesivo e inapropiado de antibióticos ha propiciado la aparición y diseminación de bacterias resistentes. La presión

selectiva que los antibióticos ejercen en determinados hábitats favorece la adquisición de sistemas de resistencia como respuesta adaptativa de los microorganismos. La resistencia es, pues, un proceso evolutivo inevitable y predecible. En estas condiciones, son frecuentes las mutaciones espontáneas; primer paso en el desarrollo de altos niveles de resistencia (Mora y García, 2007).

La aparición de resistencia a antibióticos es un fenómeno natural que puede ser debido a la diseminación de los sistemas de defensa que presentan las cepas productoras, o a cambios en genes cuyas proteínas codificadas modifican su actividad hasta ser capaces de proteger o modificar el blanco de acción o de modificar los antibióticos (Flórez, 2007).

La resistencia a antibióticos puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca o natural a un antibiótico particular o a un grupo de antibióticos está muy generalizada entre las bacterias, esto refleja la adaptación evolutiva de las bacterias a toxinas naturales en su ambiente (Cabrera y col., 2007).

La resistencia intrínseca (natural) es la que presentan, por ejemplo, los microorganismos productores de antibióticos como autodefensa frente a su efecto inhibitor. Se incluye, además, la resistencia de los microorganismos insensibles a los que no afectan determinados antibióticos, sin que ello conlleve ningún tipo de alteración (De Ahumada y col., 2002).

La resistencia adquirida, como su nombre indica, se adquiere en un determinado momento del ciclo vital del organismo, transmitiéndose con posterioridad a la descendencia. La resistencia puede adquirirse por mutación, o estar mediada por fenómenos de transferencia y adquisición génica (De Ahumada y col., 2002).

La adquisición de resistencia puede ocurrir por varios procesos (Cabrera y col., 2007):

- ★ Conjugación: transferencia de material genético contenido en plásmidos de una bacteria a otra.
- ★ Transposición: movimiento de transposones de un lugar del ADN a otro.
- ★ Transducción: Introducción de genes resistentes por un bacteriófago.
- ★ Transformación: Transferencia de genes desde un ADN desnudo de una bacteria previamente lisada a otra que lo recibe y lo incorpora a su genoma.

Los mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos son fundamentalmente de tres tipos: Inactivación por destrucción o modificación, inaccesibilidad al lugar de acción, bien por disminución de la permeabilidad o por expulsión activa y alteración en el lugar de acción (Medina, 2002).

Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o varios antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos por diversas especies bacterianas (Stanier y col., 1992).

#### **2.4.3 Resistencia a los antibióticos en bacterias ácido lácticas.**

A continuación se muestran algunos trabajos científicos realizados por diferentes autores sobre la resistencia a los antibióticos que presentan las bacterias ácido lácticas en diferentes alimentos haciendo referencia sólo a los antibióticos utilizados en este trabajo:

- ★ Mathur y col. reportaron en el 2005 la resistencia a los antibióticos tetraciclina (42,5%), ampicilina (47,5%), penicilina (77,5%), gentamicina

(79%) y cloranfenicol (11%) de las bacterias ácido lácticas aisladas en productos cárnicos y quesos fermentados.

- ★ Herreros y col. reportaron en el 2005 resistencia a los antibióticos ampicilina (55,5%), oxacilina (94,4%), cloranfenicol (66,6%), tetraciclina (50%) y ciprofloxacina (77,7%), en bacterias ácido lácticas aisladas en queso.
- ★ Belén y col. reportaron en el 2005 la susceptibilidad de las bacterias ácido lácticas a los antibióticos cloranfenicol y tetraciclina. Reportaron también resistencia al metronidazol (100%). Estas bacterias fueron aisladas de queso de cabra y del tracto gastrointestinal en humanos.
- ★ Egervarn y col. reportaron en el 2006 el efecto del tamaño del inóculo y tiempo de incubación en la susceptibilidad a los antibióticos de las bacterias ácido lácticas. Encontrando resistencia para la gentamicina y la ampicilina.
- ★ Masco y col. reportaron en el 2006 la resistencia de los antibióticos gentamicina, ciprofloxacina y tetraciclina, y la susceptibilidad para la amoxicilina/ácido clavulánico y cloranfenicol en cepas de bifidobacterias aisladas en humanos, animales y productos probióticos.
- ★ Hummel y col. reportaron en el 2007 la resistencia a los antibióticos gentamicina (70%), ciprofloxacina (70%), cloranfenicol (7%) y tetraciclina (7%) en cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de cultivos iniciadores utilizados para la fermentación de alimentos.
- ★ Salim y col. reportaron en el 2007 la resistencia a los antibióticos gentamicina (25%), tetraciclina (25%), ampicilina (0%) y cloranfenicol (0%)

en cepas de bacterias ácido lácticas y bifidobacterias en productos fermentados.

- ★ Klare y col. reportaron en el 2007 la susceptibilidad para los antibióticos penicilina, ampicilina y cloranfenicol en un 100% en bacterias ácido lácticas destinadas a productos probióticos.
- ★ Kushiro y col. reportaron en el 2009 pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas utilizando el método de microdilución y E-test, encontrando resistencia para los antibióticos gentamicina (47%) y ciprofloxacina (35%). Para los antibióticos tetraciclina, cloranfenicol y ampicilina se obtuvo un 100% de susceptibilidad.
- ★ Liu y col. reportaron en el 2009 la resistencia a los antibióticos ciprofloxacina (34%), amikacina (46%) y gentamicina (39%). Para los antibióticos cloranfenicol, ampicilina, tetraciclina y amoxicilina/ácido clavulánico obtuvieron 0% de resistencia. Estos resultados fueron obtenidos de cepas probióticas de bacterias ácido lácticas aisladas de los alimentos comercializados y drogas.
- ★ Mayrhofer y col. reportaron en el 2010 la susceptibilidad antimicrobiana de *Lactobacillus* utilizando el método de microdilución, encontrando resistencia para la tetraciclina y susceptibilidad para los antibióticos ampicilina, cloranfenicol y gentamicina.
- ★ Toomey y col. reportaron en el 2010 la caracterización y la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos en bacterias ácido lácticas aisladas de carne de cerdo y de res. Encontraron resistencia para la tetraciclina en un 6%, y para el cloranfenicol y la ampicilina 0% de resistencia.

- ★ Pan y col. reportaron en el 2011 la resistencia a los antibióticos ciprofloxacina (86%), ampicilina (78,5%), tetraciclina (64%) y cloranfenicol (64%) en bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos fermentados.
- ★ Karapetkov y col. reportaron en el 2011 la susceptibilidad de los antibióticos penicilina, cloranfenicol y tetraciclina en diferentes cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos y frutas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 General.**

- ★ Evaluar la susceptibilidad de diferentes antibióticos en bacterias ácido lácticas aisladas de productos cárnicos fermentados.

#### **3.2 Específicos.**

- ★ Aislar cepas de Bacteria Ácido Lácticas en productos cárnicos fermentados (salchichón y chorizo).
- ★ Identificar las cepas presuntivas de Bacterias Ácido Lácticas aisladas a través de pruebas bioquímicas y las pruebas API 50-CHL.
- ★ Evaluar la resistencia a antibióticos en bacterias ácido lácticas a través del método de disco difusión.
- ★ Evaluar la multiresistencia a los antibióticos en las bacterias ácido lácticas a través del factor de multiresistencia.
- ★ Detectar la concentración mínima inhibitoria de cada antibiótico a través del método de difusión en pozo.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Lugar de trabajo.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Microorganismos Patógenos de la Sección de Biotecnología y Control Microbiano, ubicado en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Central de Venezuela (UCV), el cual se encuentra ubicado en Colinas de Bello Monte, Caracas-Venezuela. En este lugar se suministró los materiales, equipos, reactivos y medios de cultivo necesarios para la elaboración de este trabajo.

### 4.2 Materiales y Equipos.

#### **Materiales:**

- ★ Muestra de salchichón y chorizo
- ★ Agua peptonada al 0,1%
- ★ Agar MRS
- ★ Agar blando
- ★ Agar Mueller Hinton
- ★ Agar MRS suave (8%)
- ★ Agar agar
- ★ Caldo MRS
- ★ Caldo tripticasa soya
- ★ Galerías API 50-CHL
- ★ API 50 CHL medium
- ★ Mechero
- ★ Gradillas
- ★ Asa de platino
- ★ Placas de Petri

- ★ Tubos de ensayo
- ★ Pipetas
- ★ Bolsas plásticas herméticas Ziploc
- ★ Hisopo
- ★ Jarra de anaerobiosis
- ★ Aceite de inmersión
- ★ Reactivos para la coloración de Gram (solución de cristal violeta, lugol, solución decolorante y safranina)

**Equipos:**

- ★ Autoclave
- ★ Balanza analítica
- ★ Estufa a 30°C
- ★ Baño a 50°C
- ★ Microscopio
- ★ Stomacher

**Antibióticos:**

- ★ Amikacina
- ★ Amoxicilina/Acido clavulánico
- ★ Ampicilina
- ★ Azitromicina
- ★ Ceftazidima
- ★ Ciprofloxacina
- ★ Cloranfenicol
- ★ Gentamicina
- ★ Metronidazol

- ★ Oxacilina
- ★ Penicilina
- ★ Tetraciclina

#### **4.3 Muestreo.**

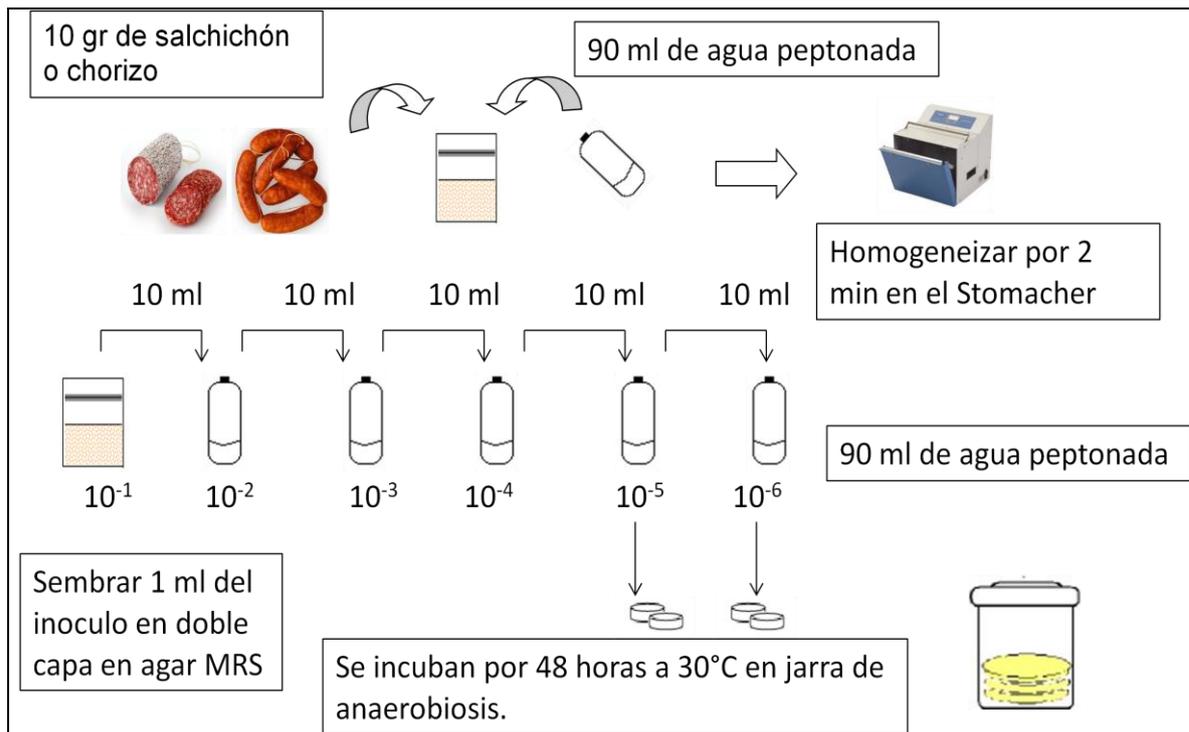
Se analizó 5 muestras por semana, durante un periodo de 8 semanas, para un total de 40 muestras (20 de salchichón y 20 de chorizo). Estas muestras fueron adquiridas en expendios comerciales de la ciudad de Caracas y transportadas al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos asépticamente y en un tiempo no mayor a 24 horas para su evaluación.

#### **4.4 Método.**

##### **4.4.1 Aislamiento de los microorganismos:**

Según la Norma Venezolana COVENIN (3006: 1993) el método consiste en sembrar un volumen dado de una muestra representativa y homogénea del alimento a analizar y/o diluciones de la misma en placas de Petri, utilizando medios de cultivo selectivos apropiados para cada microorganismo (agar MRS en doble capa). Después del período de incubación, se cuentan las colonias características y se confirma mediante examen microscópico.

A continuación se muestra el esquema realizado para el aislamiento de las bacterias ácido lácticas en muestras de salchichón y chorizo:



**Figura 3:** Aislamiento de bacterias ácido lácticas mediante siembra en doble capa con agar MRS.

#### 4.4.2 Identificación de los microorganismos:

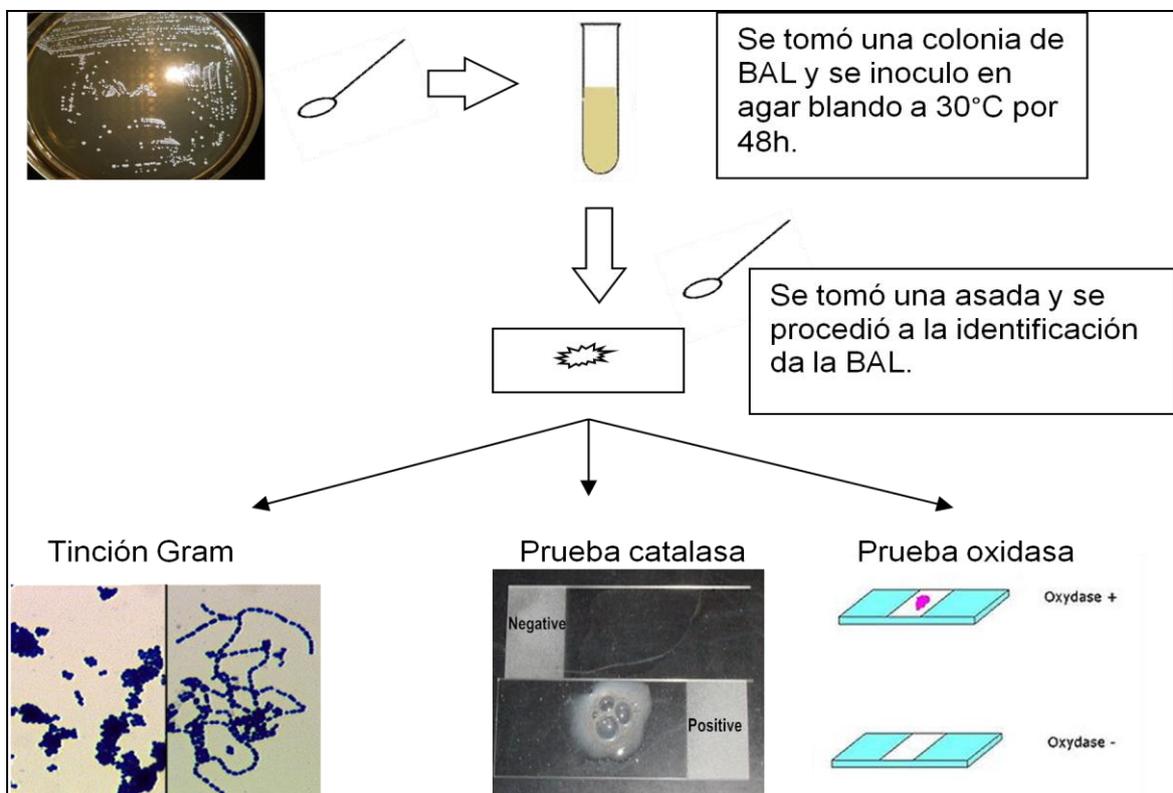
Una vez obtenida las colonias típicas para bacterias ácido lácticas en el medio MRS se procedió a realizar una tinción de Gram para verificar que eran microorganismos Gram positivos, de forma bacilar y/o coco de la siguiente manera:

- ★ Se depositó sobre un portaobjeto limpio una parte de una colonia de la muestra a analizar con la ayuda de un asa de siembra y se fijó a la flama. Se cubrió con cristal violeta durante 1 min, se lavó con agua destilada y posteriormente se aplicó lugol (yodo) durante 1 min, se descoloró con una solución de alcohol-acetona (30seg) y se lavó con agua. Por último se cubrió con safranina durante 10 seg, se lavó con agua y se procedió a observar al microscopio (Macfaddin, 2000).

Luego se procedió a realizar las pruebas de la catalasa y oxidasa las cuales son negativas para estos microorganismos de la siguiente manera:

- ★ Catalasa: se tomó con un asa para siembra parte de una colonia de la muestra a analizar y se colocó en un portaobjeto, se agregó una gota de peróxido de hidrógeno sobre el cultivo y se observó la formación inmediata o no de burbujas (liberación de gas), tomando la formación de gas como prueba positiva (Macfaddin, 2000).
- ★ Oxidasa: se tomó con un asa para siembra parte de una colonia de la muestra a analizar y se colocó en papel de filtro, se agregó unas gotas de reactivo para oxidasa (clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina) y se observó si había cambio de coloración (rosa-rojo-negro). El cambio de color señala a esta prueba como positiva (Macfaddin, 2000).

A continuación se muestra el esquema para la identificación de las BAL:



**Figura 4:** Esquema de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias ácido lácticas.



#### **4.4.3 Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas a antibióticos:**

Para el análisis de susceptibilidad se aplicó el método de disco difusión descrito por Bauer y col., en 1996. Este método se realizó con las cepas aisladas de las muestras de salchichón y chorizo y con la muestra control de *Staphylococcus aureus* (25923).

##### **Estándar de McFarland.**

Se utilizó el estándar comercial (estándar de turbidez 0,5 de McFarland), disponible en el kit de galería API 50-CHL.

##### **Preparación del cultivo.**

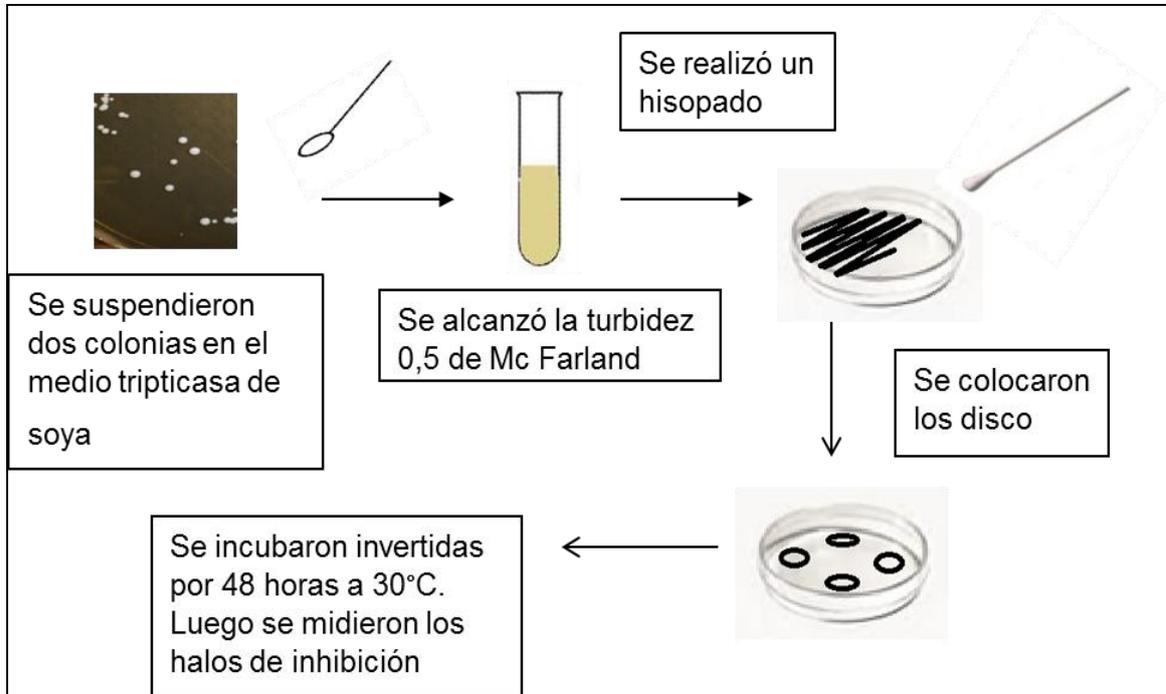
Se inoculó 2 o 3 colonias de bacterias ácido lácticas previamente aisladas e identificadas en 4 mL de caldo tripticasa soya hasta alcanzar el estándar de turbidez 0,5 de McFarland, el cual corresponde a una población de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL (Bauer y col., 1966).

##### **Aplicación de las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos.**

Se analizó la susceptibilidad de las cepas a un total de 12 antibióticos. Para ello, se extendió sobre placas de agar Mueller Hinton la suspensión de la cepa mediante un hisopo estéril. Se colocaron discos de papel secante impregnados con los antibióticos en las placas con una pinza estéril (se colocaron 4 antibióticos por placa) y se incubaron invertidas a 30°C durante 48h. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada antibiótico. El antibiótico se difundió radialmente a través del espesor del agar formándose un gradiente de concentración. Luego de 48 horas de incubación, se midió la longitud de la zona de inhibición y dependiendo de esta longitud se clasificó a las cepas como sensibles, intermedias o resistentes de acuerdo con los criterios de interpretación del manual de la CLSI,

2007 (Instituto de estándares clínicos y de laboratorio) (CLSI, por sus siglas en ingles).

En la siguiente figura se muestra el esquema realizado:



**Figura 6:** Esquema para evaluar la susceptibilidad a los antibióticos.

#### 4.4.4 Análisis de la multirresistencia:

La multirresistencia a antibióticos se calculó para cada cepa a través del índice de resistencia múltiple a antibióticos, el cual se encuentra expresado a continuación:

MAR:  $\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de antibióticos para los cuales la cepa presenta resistencia}}{\text{N}^{\circ} \text{ de antibióticos al cual se expone la cepa}}$

#### 4.4.5 Detección de la concentración mínima inhibitoria de cada antibiótico (CMI):

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó a través del método de difusión en pozo descrito por Paik y col. (1997), y se determinó en los antibióticos que causaron en las cepas la clasificación de sensibles e intermedias mediante el método de disco difusión.

### **Preparación de los antibióticos.**

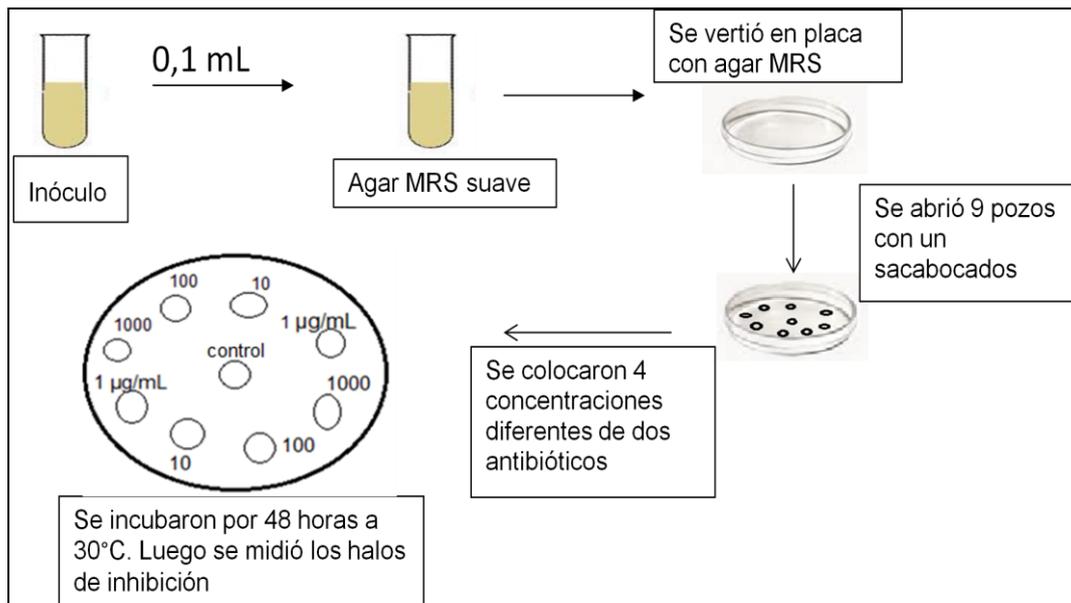
Los antibióticos fueron adquiridos en forma de suspensión o de ampolla y se realizaron distintas diluciones a partir de la concentración madre de cada uno de ellos, para alcanzar concentraciones de 10.000, 1.000, 100, 10 y 1 µg/mL).

### **Preparación del cultivo.**

Se inoculó 2 o 3 colonias de bacterias ácido lácticas previamente aisladas e identificadas en 4 mL de caldo MRS y se incubó a 30°C por 24h. Una vez transcurrido este tiempo se tomó un volumen de 0,1 mL, inoculándose en 10 ml de agar MRS suave (8%). Se homogenizó y se vertió en placas de petri que contenían agar MRS. Se esperó a que solidificara el medio y se prepararon 9 pozos (8 para ensayar 2 diferentes antibióticos a 4 concentraciones y 1 como control al cual se le agregó agua destilada) de 5 mm de diámetro con un sacabocado, colocando 30 µL de cada antibiótico en sus diferentes concentraciones. Se dejó que difundiera por completo incubando a 30°C por 48 horas.

El agar MRS suave (8%) fue preparado utilizando caldo MRS siguiendo las instrucciones de la etiqueta, y agar agar (8 gr por cada 1000 ml de agua destilada).

A continuación se muestra el esquema realizado para hallar la concentración mínima inhibitoria:



**Figura 7:** Esquema para detectar la concentración mínima inhibitoria.

#### 4.4.6 Análisis de los resultados.

##### **Comparación de los resultados obtenidos en la longitud de los halos de inhibición de las diferentes cepas con respecto a la cepa control de *Staphylococcus aureus* (25923).**

Se compararon los resultados obtenidos en la longitud de los halos de inhibición de las cepas aisladas con los resultados obtenidos en la cepa control. Se aplicó en el programa Statgraphics (versión 6.0) un análisis de varianza de una vía con un 95% de confianza para determinar si había diferencia significativa entre estos resultados.

La hipótesis nula planteada fue: no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos de las diferentes cepas y la cepa control de *Staphylococcus aureus* (25923).

##### **Comparación de los resultados obtenidos en la longitud de los halos de inhibición de las diferentes cepas de *Pediococcus pentosaceus* entre sí.**

Se compararon los resultados obtenidos en la longitud de los halos de inhibición de las diferentes cepas de *Pediococcus pentosaceus* entre sí. Se aplicó en el programa Statgraphics (versión 6.0) un análisis de varianza de una vía con un 95% de confianza para determinar si hay diferencia significativa entre estos resultados.

La hipótesis nula planteada fue: no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos de las diferentes cepas entre sí.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Aislamiento e identificación de las cepas de bacterias ácido lácticas.

Para el aislamiento de estas bacterias se utilizó el medio MRS por ser un medio selectivo. La presencia de la peptona, glucosa, manganeso y magnesio aportan los componentes nutritivos y energéticos para el crecimiento de los Lactobacilos. El di-Amonio Hidrógeno Citrato inhibe el crecimiento de la mayor parte de gérmenes contaminantes. El di-Potasio Hidrógeno Fosfato se emplea para estabilizar el pH del medio, mientras que el Tween 80 constituye su fuente de ácidos grasos. De esta manera este medio es ideal para el crecimiento masivo de todas las cepas de Lactobacilos, incluso aquellas de crecimiento lento y difícil (CULTIMED, 2003).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se determinaron los títulos de las bacterias ácido lácticas en las muestras de salchichón y chorizo analizadas, obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla 1:** Títulos obtenidos en las 20 de muestras de salchichón.

Muestra	Título (UFC/gr)	Muestra	Título (UCF/gr)
1	5,9x10 <sup>7</sup>	11	1,03 x10 <sup>7</sup>
2	6,4 x10 <sup>7</sup>	12	1,17 x10 <sup>7</sup>
3	6,1 x10 <sup>7</sup>	13	3,1 x10 <sup>7</sup>
4	5,5 x10 <sup>7</sup>	14	1,2 x10 <sup>7</sup>
5	3,9 x10 <sup>7</sup>	15	1,2 x10 <sup>7</sup>
6	3,1 x10 <sup>7</sup>	16	1,8 x10 <sup>7</sup>
7	4,9 x10 <sup>7</sup>	17	8,1 x10 <sup>7</sup>
8	3,4 x10 <sup>7</sup>	18	1,8 x10 <sup>7</sup>
9	3,8 x10 <sup>7</sup>	19	1,4 x10 <sup>7</sup>
10	4,3 x10 <sup>7</sup>	20	1,4 x10 <sup>7</sup>

Se puede observar que para la muestra de salchichón se obtuvo un título con exponencial de 10<sup>7</sup> para las 20 muestras.

A continuación se muestra los títulos obtenidos para las 20 muestras de chorizo:

**Tabla 2:** Títulos obtenidos en las 20 de muestras de chorizo.

Muestra	Título (UFC/gr)	Muestra	Título (UCF/gr)
1	$5,0 \times 10^6$	11	$6,4 \times 10^6$
2	$4,7 \times 10^6$	12	$5,8 \times 10^6$
3	$5,1 \times 10^6$	13	$9,3 \times 10^6$
4	$3,9 \times 10^6$	14	$4,05 \times 10^6$
5	$8,3 \times 10^6$	15	$8,4 \times 10^6$
6	$7,9 \times 10^6$	16	$9,0 \times 10^6$
7	$3,2 \times 10^6$	17	$7,8 \times 10^6$
8	$3,5 \times 10^6$	18	$9,8 \times 10^6$
9	$5,6 \times 10^6$	19	$4,8 \times 10^6$
10	$4,1 \times 10^6$	20	$6,4 \times 10^6$

Los títulos obtenidos para esta muestra son de un exponencial de  $10^6$ , siendo la carga de bacterias ácido lácticas en chorizo menor que para la muestra de salchichón.

Estas concentraciones de BAL corresponden a la concentración que se encuentran en los productos fermentados. Según Martín, 2005 las BAL se desarrollan rápidamente durante el proceso fermentativo y evolucionan desde  $10^3$ - $10^4$  ufc/gr hasta  $10^8$ - $10^9$  ucf/gr al final de la fermentación.

A partir del crecimiento obtenido en el medio MRS se seleccionaron 200 colonias (5 colonias por cada muestra) típicas para las bacterias ácido lácticas, es decir, colonias pequeña, de color blanco cremoso, de forma redonda y de superficie convexa, lo que corresponde a sus características ya reportadas (Ortiz, 2006).

En la siguiente figura se muestra las colonias aisladas del medio MRS:



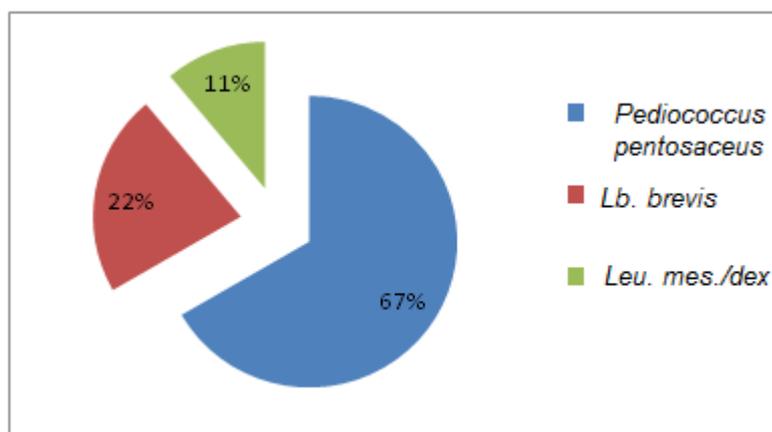
**Figura 8:** Colonias características de bacterias ácido lácticas.

A estas 200 colonias se les realizó tinción Gram obteniéndose 165 colonias Gram positivas y 35 Gram negativas. De estas 165 colonias Gram positivas 101 colonias presentaron morfología de coco y 64 presentaron morfología de bacilos.

Luego se realizó la prueba de la catalasa y la oxidasa, obteniéndose un resultado negativo para las 165 colonias. De esta manera se identificaron presuntivamente a las BAL como cocos o bacilos Gram positivos, catalasa y oxidasa negativos.

Para confirmar que estas 165 colonias pertenecían a los géneros de bacterias ácido lácticas, se procedió a realizar la prueba API 50 CHL. Los resultados obtenidos constituyeron el perfil bioquímico y permitieron la identificación del microorganismo con la ayuda de un programa informático Apilab plus (Biomerieux), con el cual se obtuvo que un 90% pertenecía a cepas de bacterias ácido láctica y el otro 10% no pertenecía a este género.

Del 90% confirmado el 66,6% pertenecía a la especie de *Pediococcus pentosaceus* con un 99,9% de confianza. El 22,2% pertenecía a la especie *Lactobacillus brevis* con un 85,6% de confianza. Y el 11,1% pertenecía a la especie *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum* con un 92% de confianza.



**Figura 9:** Porcentaje de identificación de las BAL.

Según Martín (2005) las BAL que más frecuentemente se encuentran en productos cárnicos fermentados pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*; siendo *Lactobacillus* el género que predomina en estos productos.

Una vez identificados las cepas de BAL, se tomaron 9 cepas y una cepa control para el posterior estudio de la siguiente manera:

**Tabla 3:** Cepas utilizadas para el estudio de este trabajo.

Muestra	Cepa	Especie
	Control	<i>Staphylococcus aureus</i> (25923).
Salchichón	1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Chorizo	6	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	7	<i>Lactobacillus brevis</i>
	8	<i>Leuconostoc mes/dex.</i>
	9	<i>Lactobacillus brevis</i>

La realización de estos procedimientos requiere la utilización de cepas de control de calidad con resultados conocidos, de manera de saber si nuestra metodología se realizó en forma correcta (Taroco y col., 2006).

Para las bacterias ácido lácticas la cepa control es *Staphylococcus aureus* (25923) según el manual CLSI (2007).

## **5.2 Evaluación de la susceptibilidad de las BAL.**

Para la evaluación de la susceptibilidad se utilizó el agar Mueller Hinton, debido a que es un medio apropiado para la realización de estas pruebas por su buena reproducibilidad entre los diferentes lotes comerciales, son económicos, contienen bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas, son adecuados para la mayoría de las bacterias en lo que a requerimientos nutricionales se refiere y existen suficientes datos recopilados que avalan su uso en las pruebas de sensibilidad (Taroco y col., 2006).

Una vez medidos los diámetros de los halos de inhibición se clasificaron a las cepas como sensible, intermedias y resistentes según el manual CLSI (2007). Estas se definen como (Ruíz y col., 2001; Uzcátegui, 2012):

- ★ Cepas sensibles: Estas cepas pueden ser apropiadamente tratadas con dosis de antibióticos recomendadas para un tipo de infección particular.
- ★ Cepas intermedias: Son aquellas cepas cuyas concentraciones mínimas inhibitorias se aproximan a los niveles alcanzables en tejidos y sangre, y para los que la tasa de respuesta puede ser más baja que la de las cepas sensibles.
- ★ Cepas resistentes: Estas cepas no son inhibidas por las concentraciones usualmente alcanzables de un agente con régimen terapéutico normal, por lo tanto la eficacia clínica no es confiable en estudios terapéuticos.

A continuación se muestra los porcentajes de susceptibilidad de las cepas a los 12 antibióticos utilizados:

**Tabla 4:** Porcentaje de susceptibilidad antibiótica.

Antibiótico	Porcentaje de susceptibilidad (%)		
	Cepa sensible	Cepa intermedia	Cepa resistente
Amox/ac. Cla	100	0	0
Ampicilina	100	0	0
Penicilina	90	0	10
Oxacilina	0	0	100
Ceftazidima	30	0	70
Amikacina	100	0	0
Gentamicina	100	0	0
Tetraciclina	0	0	100
Ciprofloxacina	10	20	70
Cloranfenicol	100	0	0
Azitromicina	100	0	0
Metronidazol	0	0	100

Amox/ac. Cla: amoxicilina/ácido clavulánico.

Se puede observar en la tabla 2 que 6 antibióticos presentan el 100% de susceptibilidad en las cepas (Amoxicilina/ác. Clavulánico, amikacina, gentamicina, ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina). A continuación sigue la penicilina con un 90% de susceptibilidad, ceftazidima con un 30% y ciprofloxacina con un 10%. Para los antibióticos tetraciclina, oxacilina y metronidazol se obtuvo 0%, es decir que las cepas fueron resistentes a estos antibióticos.

Estos resultados coinciden con los reportados por Cueto y col. en el 2010 en donde las cepas presentaron sensibilidad en un 90 al 100% para los antibióticos Amoxicilina/ácido Clavulánico, amikacina, gentamicina, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina y penicilina.

A continuación se muestra las tablas con la longitud de los halos de inhibición y su clasificación en sensible, intermedia o resistentes según el manual CLSI por antibiótico:

★ **Amoxicilina/ácido clavulánico.**

En la tabla 5 se muestra los halos de inhibición para el antibiótico amoxicilina/ácido clavulánico y su clasificación de sensibilidad:

**Tabla 5:** Longitud de los halos de inhibición para la amoxicilina/ácido clavulánico.

Cepas	Longitud de los halos en mm									
	Cepa control	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9
	35	33	29	28	33	30	32	33	32	35
	34	34	26	27	32	30	32	32	32	31
<b>Promedio</b>	<b>34,5</b>	<b>33,5</b>	<b>27,5</b>	<b>27,5</b>	<b>32,5</b>	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>32,5</b>	<b>32</b>	<b>33</b>
Clasificación	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: sensible

Todas las cepas presentaron en promedio halos de inhibición superiores a 27 mm, dándoles a éstas una clasificación de sensibles, lo que coloca al antibiótico amoxicilina/ácido clavulánico con un 0% de resistencia.

Estos resultados coinciden con los reportados por Liu y col. en el 2009, donde obtuvieron un 100% de susceptibilidad para este antibiótico.

También Masco y col. en el 2006 obtuvieron un 100% de susceptibilidad a la amoxicilina/ácido clavulánico en cepas aisladas en humanos y productos probióticos.

Mora y García (2007) hacen mención que *Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus spp.* son considerados por regla general, susceptibles a la amoxicilina/ ácido clavurónico.

#### ★ Ampicilina.

A continuación se muestra la tabla 6 con la longitud de los halos de inhibición para la ampicilina y su clasificación de sensibilidad:

**Tabla 6:** Longitud de los halos de inhibición para la ampicilina.

Cepas	Longitud de los halos en mm									
	Cepa control	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9
	30	20	20	19	18	19	25	30	39	23
	30	19	19	19	23	20	23	31	38	26
<b>Promedio</b>	<b>30</b>	<b>19,5</b>	<b>19,5</b>	<b>19</b>	<b>20,5</b>	<b>19,5</b>	<b>24</b>	<b>30,5</b>	<b>38,5</b>	<b>24,5</b>
Clasificación	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: sensible

Este antibiótico causo el 100% de susceptibilidad en todas las cepas, con halos de inhibición mayores a 19 mm. Estos datos coinciden con los reportados por Liu y col. (2009), los cuales también obtuvieron el 100% de susceptibilidad para este antibiótico en las 41 cepas estudiadas.

A diferencia de estos autores, los datos reportados por Pan y col. (2011), muestran un 78% de resistencia para la ampicilina. Herreros y col. (2005), sin embargo obtuvieron un 55,5% de resistencia para 18 cepas estudiadas.

Por otro lado, un cien por ciento (100%) de susceptibilidad en las cepas estudiadas ha sido reportado en otros trabajos (Toomey y col. 2010; Kushiro y col., 2009; Mayrhofer y col.2010 y Salim y col. 2007).

★ **Penicilina.**

Los halos de inhibición para la penicilina y su clasificación de sensibilidad se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 7:** Longitud de los halos de inhibición para la penicilina.

Cepas	Longitud de los halos en mm									
	Cepa control	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9
	28	25	21	21	21	21	24	30	33	31
	27	21	24	23	24	20	23	32	30	29
<b>Promedio</b>	<b>27,5</b>	<b>23</b>	<b>22,5</b>	<b>22</b>	<b>22,5</b>	<b>20,5</b>	<b>23,5</b>	<b>31</b>	<b>31,5</b>	<b>30</b>
Clasificación	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: sensible  
R: resistente

Todas la cepas de bacterias ácido lácticas fueron susceptibles a la penicilina, sólo la cepa control presentó resistencia a este antibiótico con un diámetro de inhibición de 27,5 mm.

Según Stephen (2005) en el año 1944, dos años después de la introducción de la penicilina, se reportó el primer *S. aureus* resistente a la penicilina. Se encontró que éste produjo una enzima penicilinasas (un tipo de

betalactamasa) que hidrolizó el anillo beta-lactámico de la penicilina. En la actualidad, en muchas regiones geográficas la resistencia a la penicilina debida a la producción de beta-lactamasa excede el 90%.

La susceptibilidad de las BAL a la penicilina coincide con los datos de Klare y col. en el 2007 en donde reportan un 100% de susceptibilidad para la penicilina en bacterias ácido lácticas destinadas a productos probióticos. Sin embargo Mathur y col. En el 2005 si reportaron resistencia para la penicilina en un 77,5%.

Estos tres antibióticos (amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina y penicilina) pertenecen al grupo betalactámico, los cuales presentan interferencia con la síntesis de la pared celular (De Ahumada y col., 2002).

Puesto que las bacterias Gram positivas no poseen una membrana externa, los antibióticos betalactámicos se difunden a través de la pared celular. En las células susceptibles, las moléculas betalactámicas se unen a las proteínas de unión de penicilina (PBPs), lo que resulta en paredes celulares debilitadas y lisis celular (Stephen, 2005).

Debido a que las bacterias ácido lácticas son Gram positivas estos antibióticos difunde más fácilmente a través de la pared celular por no presentar membrana externa, ocasionando la lisis celular y por consiguiente la susceptibilidad en un 100% en las cepas.

★ **Oxacilina.**

A continuación se muestra la tabla 8 con los halos de inhibición para la oxacilina y su clasificación de sensibilidad:

**Tabla 8:** Longitud de los halos de inhibición para la oxacilina.

Cepas	Longitud de los halos en mm									
	Cepa control	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9
	14	11	0	0	9	12	11	0	0	0
14	10	0	0	7	9	9	0	0	0	
<b>Promedio</b>	<b>14</b>	<b>10,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>10,5</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Clasificación	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R: resistente

Los halos de inhibición para todas las cepas fueron inferiores a 14 mm de diámetro, lo que les da una clasificación de resistentes en un 100% para este antibiótico.

Estos resultados coinciden con los reportados por Herreros y col. en el 2005, cuyos resultados arrojaron un 94,4% de resistencia para la oxacilina en BAL aisladas en queso.

★ **Ceftazidima.**

En la tabla 9 se muestra los halos de inhibición para en antibiótico ceftazidima y su clasificación de sensibilidad:

**Tabla 9:** Longitud de los halos de inhibición para la ceftazidima.

Cepas	Longitud de los halos en mm									
	Cepa control	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9
	25	8	10	8	11	10	6	9	21	21
27	8	10	8	9	10	6	8	23	22	
<b>Promedio</b>	<b>26</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>8,5</b>	<b>22</b>	<b>21,5</b>
Clasificación	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S

S: sensible

R: resistente

Sólo dos cepas de BAL y la cepa control presentaron susceptibilidad a la ceftazidima, el resto de las cepas (70%) fueron resistentes a este antibiótico.

Estos dos últimos antibióticos (oxacilina y ceftazidima) también pertenecen al grupo de los betalactámico, que inhiben la pared celular, sin embargo las cepas presentaron resistencia a estos antibióticos.

Esto puede ser debido a una resistencia adquirida por las bacterias ácido lácticas, desarrollando enzimas beta-lactamasas las cuales son secretadas extracelularmente en el medio circundante y destruyen las moléculas betalactámicas antes que estas tengan oportunidad de entrar en la célula (Stephen, 2005).

★ **Amikacina.**

A continuación se muestra la tabla 10 con los halos de inhibición para la amikacina y su clasificación de sensibilidad:

**Tabla 10:** Longitud de los halos de inhibición para la amikacina.

Cepas	Longitud de los halos en mm									
	Cepa control	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9
	34	23	28	27	29	29	36	31	24	25
	34	28	25	26	29	30	33	30	28	27
<b>Promedio</b>	<b>34</b>	<b>25,5</b>	<b>26,5</b>	<b>26,5</b>	<b>29</b>	<b>29,5</b>	<b>34,5</b>	<b>30,5</b>	<b>26</b>	<b>26</b>
Clasificación	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: sensible

El antibiótico amikacina causó un 100% de susceptibilidad en todas las cepas con halos de inhibición mayores a 26 mm, datos que difieren con Liu y col. en el 2009, los cuales reportaron un 46% de resistencia para este antibiótico en 41 cepas estudiadas.

★ **Gentamicina.**

Los halos de inhibición para la gentamicina y su clasificación de sensibilidad se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 11:** Longitud de los halos de inhibición para la gentamicina.

Cepas	Longitud de los halos en mm									
	Cepa control	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9
	35	28	28	28	30	24	34	29	28	22
33	31	26	32	30	30	32	27	27	26	
<b>Promedio</b>	<b>34</b>	<b>29,5</b>	<b>27</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>27</b>	<b>33</b>	<b>28</b>	<b>27,5</b>	<b>24</b>
Clasificación	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: sensible

Todas las cepas presentaron halos de inhibición mayores a 24 mm de diámetro, dándoles para este antibiótico, la clasificación de sensibles.

Estos datos coinciden con lo reportado por Mayrhofer y col. en el 2005, los cuales encontraron un 100% de susceptibilidad en las 101 cepas estudiadas. Sin embargo otros autores como Liu y col. en el 2009 encontraron resistencia a la gentamicina en un 39%.

También Mathur y col. (2005), Kushiro y col. (2009), Salim y col. (2007), y Hummel y col. (2007), encontraron resistencia en un 79%, 47%, 25%, y 70% respectivamente.

Estos dos antibióticos (amikacina y gentamicina) pertenecen al grupo aminoglucósidos, los cuales inhiben la síntesis proteica mediante el enlace a la subunidad ribosómica 30S (De Ahumada y col., 2002).

Estos antibióticos se unen a la subunidad 30S del ribosoma y pueden bloquear la síntesis de proteínas de dos maneras diferentes. En primer lugar estos se pueden adherir a la subunidad 30S del ribosoma y prevenir que la subunidad 30S se adhiera al ARN mensajero (ARNm). Segundo, la presencia del aminoglucósido en el ribosoma podría provocar la lectura errada del ARNm. Esto resulta en la inserción de aminoácidos erróneos en la proteína o en la

interferencia con la capacidad de los aminoácidos para conectarse unos con otros (Stephen, 2005).

Estas actividades por lo general ocurren de manera simultánea y el efecto total es bactericida otorgando a las cepas la susceptibilidad a estos antibióticos.

★ **Tetraciclina.**

A continuación se muestra la tabla 12 con los halos de inhibición para la tetraciclina y su clasificación de sensibilidad:

**Tabla 12:** Longitud de los halos de inhibición para la tetraciclina.

Cepas	Longitud de los halos en mm									
	Cepa control	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9
	13	16	11	12	9	10	10	10	12	14
	12	11	9	11	9	9	11	9	13	14
<b>Promedio</b>	<b>12,5</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>11,5</b>	<b>9</b>	<b>9,5</b>	<b>10,5</b>	<b>9,5</b>	<b>12,5</b>	<b>14</b>
Clasificación	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R: resistente

Este antibiótico causó el 100% de resistencia en todas las cepas, con diámetros de inhibición menores a 14 mm. Estos datos difieren con los reportados por Herreros y col. en el 2005, los cuales reportaron para este antibiótico un 50% de resistencia en 18 cepas estudiadas. Sin embargo Pan y col. en el 2011 reportan 64% de resistencia para este antibiótico en 14 cepas estudiadas.

Por el contrario, en otros trabajos se han reportado el 100% de susceptibilidad para el antibiótico tetraciclina (Liu y col. 2009, Belén y col. 2005, Toomey y col. 2010 y Kushiro y col. 2009).

Este antibiótico pertenece al grupo de las tetraciclinas la cual inhibe la síntesis proteica mediante el enlace a la subunidad ribosómica 30S y bloquea la adherencia del ARN de transferencia (ARNt). Dado que no se pueden agregar

más aminoácidos a la cadena de proteínas que está en crecimiento, la síntesis de proteínas es inhibida (Stephen, 2005).

Según Flórez (2007) la resistencia presentada por las cepas a la tetraciclina es adquirida por mutación, presentando genes de resistencia tet(M).

★ **Ciprofloxacina.**

En la tabla 13 se muestran los halos de inhibición para la ciprofloxacina y su clasificación de sensibilidad:

**Tabla 13:** Longitud de los halos de inhibición para la ciprofloxacina.

Cepas	Longitud de los halos en mm									
	Cepa control	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9
	35	5	0	14	10	8	13	12	17	15
	33	9	0	12	10	6	11	11	16	16
<b>Promedio</b>	<b>34</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>11,5</b>	<b>16,5</b>	<b>15,5</b>
Clasificación	S	R	R	R	R	R	R	R	I	I

S: sensible  
R: resistente  
I: intermedio

Este antibiótico causo tres clasificaciones para las diferentes cepas. Para la cepa control se obtuvo un diámetro de inhibición de 34 mm, lo que le confiere la clasificación de sensible. Para las siguientes 7 cepas de bacterias ácido lácticas se obtuvo la clasificación de resistentes con diámetros menores a 15 mm. Las dos últimas presentaron diámetros de 15-16 mm y fueron clasificadas como intermedia.

Estos datos coinciden con lo reportado por Herreros y col. en el 2005, los cuales evidencian un 77,7% de resistencias en las 18 cepas estudiadas. Pan y col. en el 2011, también reportan un alto porcentaje de resistencia (86%) para este antibiótico. Sin embargo, Kushiro y col. (2009) reportaron un bajo porcentaje de resistencia (35%) en las 17 cepas evaluadas.

Este antibiótico pertenece al grupo de las quinolonas, que inhiben la síntesis de los ácidos nucleicos (De Ahumada y col., 2002). Este antibiótico interfiere con la síntesis de ADN bloqueando la enzima ADN girasa. La ADN girasa ayuda a enrollar y desenrollar el ADN durante la replicación de ADN. La enzima se adhiere al ADN e introduce rupturas dobles en las cadenas que permiten al ADN desenrollarse. Las quinolonas se unen al complejo ADN girasa-ADN y permiten a las cadenas de ADN rotas liberarse dentro de la célula lo que conduce a la muerte celular (Stephen, 2005).

La resistencia del 70% en las cepas puede ser debida a mutaciones en los genes cromosómicos de la ADN girasa (resistencia adquirida) (Stephen, 2005).

★ **Cloranfenicol.**

A continuación se muestra la tabla 14 con los halos de inhibición para el cloranfenicol y su clasificación de sensibilidad:

**Tabla 14:** Longitud de los halos de inhibición para el cloranfenicol.

Cepas	Longitud de los halos en mm									
	Cepa control	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9
	36	26	26	26	30	26	30	31	22	23
34	26	32	28	27	26	31	29	26	22	
<b>Promedio</b>	<b>35</b>	<b>26</b>	<b>29</b>	<b>27</b>	<b>28,5</b>	<b>26</b>	<b>30,5</b>	<b>30</b>	<b>24</b>	<b>22,5</b>
Clasificación	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: sensible

Todas las cepas presentaron halos de inhibición superiores a los 24 mm de diámetro, otorgándoles la clasificación de sensibles. Estos datos coinciden con lo reportado por otros autores (Belén y col. 2005, Toomey y col. 2010, Kushiro y col. 2009 y Klare y col. 2007), los cuales obtuvieron el 100% de susceptibilidad en las cepas estudiadas.

Al contrario Herreros y col. en el 2005, obtuvieron 66,6% de resistencia en las cepas de BAL, mientras que Pan y col. en el 2011, obtuvieron un 64% de resistencia.

Este antibiótico pertenece al grupo de los anfenicoles cuyo modo de acción implica la inhibición de la síntesis proteica mediante la unión a la subunidad ribosómica 50S e interfiere con la unión de aminoácidos a la proteína en crecimiento (Stephen, 2005), por lo cual causa el 100% de susceptibilidad en las cepas estudiadas.

★ **Azitromicina.**

Los halos de inhibición para la azitromicina y su clasificación de sensibilidad se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 15:** Longitud de los halos de inhibición para la azitromicina.

Cepas	Longitud de los halos en mm									
	Cepa control	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9
	32	39	43	41	44	43	44	43	38	36
	32	37	43	40	43	44	42	44	37	36
<b>Promedio</b>	<b>32</b>	<b>38</b>	<b>43</b>	<b>40,5</b>	<b>43,5</b>	<b>43,5</b>	<b>43</b>	<b>43,5</b>	<b>37,5</b>	<b>36</b>
Clasificación	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: sensible

Este antibiótico causó el 100% de susceptibilidad en todas las cepas estudiadas con halos de inhibición superiores a los 32 mm de diámetro. La azitromicina fue el antibiótico que presentó los mayores diámetros de los halos de inhibición.

Para este antibiótico no se hallaron estudios, con cepas lácticas, realizados por otros autores que permitieran la comparación con los resultados obtenidos en este trabajo.

La azitromicina pertenece al grupo de los macrólidos, los cuales se caracterizan por inhibir la síntesis proteica mediante la unión a la subunidad ribosómica 50S. Este antibiótico se adhiere a la subunidad ribosómica 50S provocando la terminación del crecimiento de la cadena proteica y la inhibición de la síntesis de proteínas (Stephen, 2005). En torno a esto, es posible dilucidar que esta inhibición es responsable del 100% de susceptibilidad hallado en todas las cepas.

★ **Metronidazol.**

A continuación se muestra la tabla 16 con los halos de inhibición para el metronidazol y su clasificación de sensibilidad:

**Tabla 16:** Longitud de los halos de inhibición para el metronidazol.

Cepas	Longitud de los halos en mm									
	Cepa control	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9
	12	12	8	7	8	6	16	0	0	0
	14	12	8	11	8	8	14	0	0	0
<b>Promedio</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Clasificación	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R: resistente

Este antibiótico causó, el 100% de resistencia en todas las cepas estudiadas, con halos de inhibición menores a 15 mm de diámetro. Datos que coinciden con lo reportado por Belén y col. en el 2005, los cuales obtuvieron el 100% de resistencia en todas las cepas de BAL.

Este antibiótico pertenece al grupo de los nitroimidazoles que inhiben la síntesis del ADN, ocasionando pérdida de la estructura helicoidal, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular, siendo activado por un proceso de

reducción en aquellas células que poseen un sistema enzimático adecuado (De Ahumada y col., 2002).

La resistencia de las cepas se debe a una resistencia intrínseca al metronidazol, lo que parece deberse a la ausencia en estos microorganismos de la cadena de citocromos (Flórez, 2007).

Según Mora y García (2007) esta resistencia intrínseca se debe a que las BAL no poseen actividad hidrogenasa, la cual está implicada en el efecto intracelular del metronidazol y que es necesaria para la producción de sus metabolitos activos.

### 5.3 Análisis de multirresistencia.

En la siguiente tabla se muestra los índices de multirresistencia calculados para las 9 cepas y la cepa control:

**Tabla 17:** Índice de multirresistencia para cada cepa.

Cepa	Patrón de resistencia	Índice de MAR
Control	Tetra -Oxa-Pen-Met	0,33
1	Tetra -Oxa-Cip-Cef-Met	0,416
2	Tetra -Oxa-Cip-Cef-Met	0,416
3	Tetra -Oxa-Cip-Cef-Met	0,416
4	Tetra -Oxa-Cip-Cef-Met	0,416
5	Tetra -Oxa-Cip-Cef-Met	0,416
6	Tetra -Oxa-Cip-Cef-Met	0,416
7	Tetra -Oxa-Cip-Cef-Met	0,416
8	Tetra -Oxa-Met	0,25
9	Tetra -Oxa-Met	0,25

Tetra: tetraciclina, Oxa: oxacilina, Pen: penicilina, Met: metrinidazol, Cip: ciprofloxacina, Cef: ceftazidima.

Una cepa es multirresistente si el índice de multirresistencia es mayor a 0,2 (Vanegas y col., 2009).

En la tabla 17 se puede observar que las 9 cepas y la cepa control presentaron índices de multirresistencia superiores a 0,2 indicándonos que el 100% de las cepas son multirresistentes con tres patrones diferentes: Tetra – Oxi-Pen-Met, Tetra -Oxi-Cip-Cef-Met y Tetra –Oxi-Met.

Esto difiere con lo reportado con Belén y col. en el 2005, los cuales no hallaron multirresistencia en las cepas de BAL estudiadas, aisladas de queso y del tracto gastrointestinal. Sin embargo, Temmerman y col., en el 2002, encontraron un 68,4% de multirresistencia en las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos probióticos.

La multirresistencia en los microorganismos comensales es de suma importancia debido a que estos se pueden convertir en reservorio y transferir la resistencia a los microorganismos patógenos.

Dado que las materias primas no pueden esterilizarse porque se alteran de forma irreversible sus características organolépticas, las BAL entran en contacto con bacterias patógenas y oportunistas durante las fermentaciones alimentarias y, por supuesto, durante el tránsito gastrointestinal de los productos fermentados. En este contexto, cobra todo su sentido la hipótesis del reservorio, y más aún cuando varios autores sostienen que la cadena alimentaria es una de las principales vías de transmisión de las resistencias a antibióticos (Flórez, 2007).

Cuando los antibióticos causan en las cepas resistencia intrínseca, esta no puede ser transmitida a otras bacterias debido a que es propia del microorganismo y se debe a su estructura o metabolismo. En este sentido la

resistencia ocasionada por el metronidazol no puede ser transmitida a otros microorganismos, ya que se debe a la ausencia de citocromo.

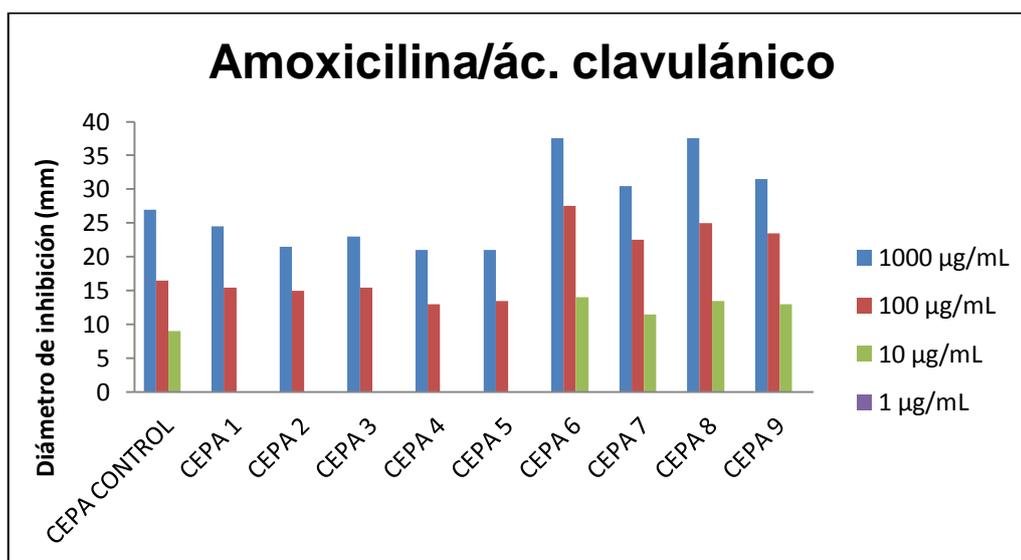
#### 5.4 Detección de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

La CMI se define como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (Taroco y col., 2006).

Según el método de Paik y col. (1997), la última concentración del antibiótico a la cual no hubo crecimiento de las BAL después de su tiempo de incubación a 30°C/48 h, se definió como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

A continuación se muestra el promedio de los diámetros de inhibición de todas las cepas por antibióticos que causaron la clasificación de las mismas en sensible e intermedio, según el método de disco difusión:

##### ★ Amoxicilina /ácido clavulánico.



**Figura 10:** Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico amoxicilina/ácido clavulánico.

La cepa control y las cepas 6, 7, 8 y 9 fueron inhibidas a una concentración de 10 µg/mL (50%). El resto de las cepas necesitaron una mayor concentración de este antibiótico (100 µg/mL).

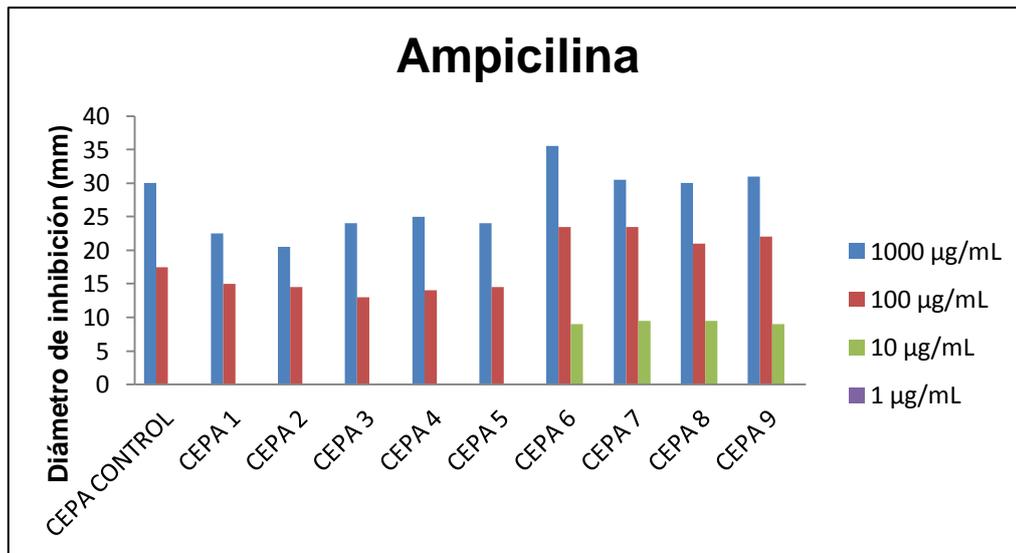
La cepa 8 es la que presenta mayor susceptibilidad con diámetro de inhibición de 13,5 mm y una CMI de 10 µg/mL, mientras que la cepa 4 fue la más resistente (este término de resistente se utiliza para referirnos a una menor sensibilidad al antibiótico), al presentar una CMI de 100 µg/mL para este mismo antibiótico, mostrando un halo de inhibición de 13 mm.

Estos datos coinciden con los reportados por Mora y García en el 2007, los cuales obtuvieron una CMI de 10 µg/mL en el 50% de las cepas, y el otro 50% presentaron CMI de 100 µg/mL. Sin embargo, Ivette y col. en el 2007, obtuvieron CMI bajas para este antibiótico de 2-16 µg/mL.

Flórez en el 2005 realizó un estudio con 23 cepas de BAL aisladas a partir de queso azul, obteniendo una CMI en una rango de 0,25 a 32 µg/mL. Las cepas ensayadas por este autor mostraron mayor susceptibilidad a este antibiótico ya que 16 de sus cepas fueron inhibidas en un rango de 2-4 µg/mL.

#### ★ **Ampicilina.**

En la siguiente figura se muestran la CMI de la ampicilina para cada cepa:



**Figura 11:** Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico ampicilina.

En esta figura se puede observar que la cepa control y las 5 cepas siguientes presentaron una CMI de 100 µg/mL, mientras que las últimas 4 presentaron una CMI de 10 µg/mL. En este sentido se puede apreciar que la cepa 8 es la más susceptible a la ampicilina con una CMI de 10 µg/mL y un diámetro de inhibición de 9,5 mm. La cepa que presentó mayor resistencia fue la cepa 3, con una CMI de 100 µg/mL y un diámetro de 13 mm.

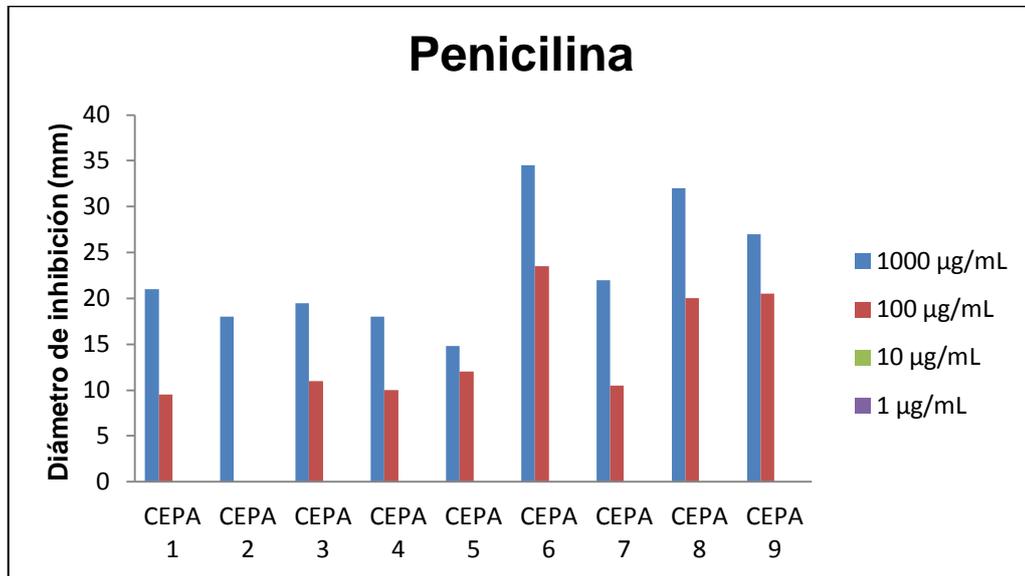
Pan y col. en el 2011, reportaron una CMI de 8-32 µg/mL para este antibiótico, coincidiendo con la CMI para las cepas 6, 7, 8 y 9.

En un estudio realizado por Mora y García en el 2007 reportaron una CMI de 10 µg/mL para el 10% de sus cepas. El otro 75% de las cepas presentaron una CMI de 100 µg/mL.

Estos resultados coinciden con las CMI obtenidas para este antibiótico ya que se obtuvo una CMI de 10 µg/mL en el 40% de las cepas y 100 µg/mL en el 60% de las cepas restantes.

### ★ Penicilina.

A continuación se muestra la figura 12 con la CMI de la penicilina para cada cepa:



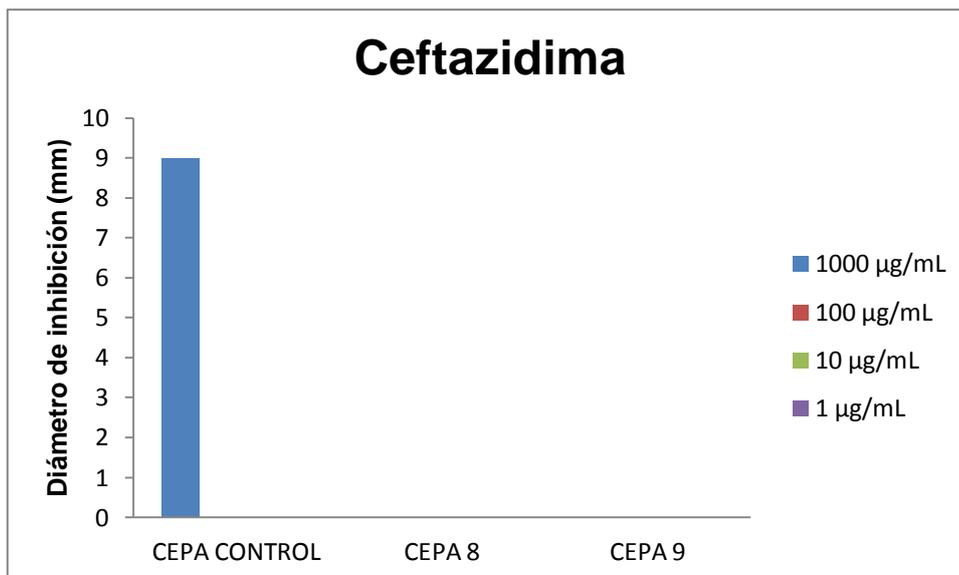
**Figura 12:** Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico penicilina.

Todas las cepas presentaron una CMI de 100 µg/mL. Solo la cepa 2 necesito de una CMI mayor (1000 µg/mL) para ser inhibida. La cepa 6 fue la más susceptible con una CMI de 100 µg/mL y un diámetro de 34,5 mm.

Estos datos difieren con lo reportado por Ivette y col. (2007), los cuales obtuvieron cepas muy susceptibles con CMI de 2-64 µg/mL. Por su parte, Mora y García en el 2007, obtuvieron una CMI de 10 µg/mL en un 50% de sus cepas estudiadas y 100 µg/mL en el 50% de las cepas restantes.

### ★ Ceftazidima.

En la figura 13 se muestran la CMI de la ceftazidima para cada cepa:

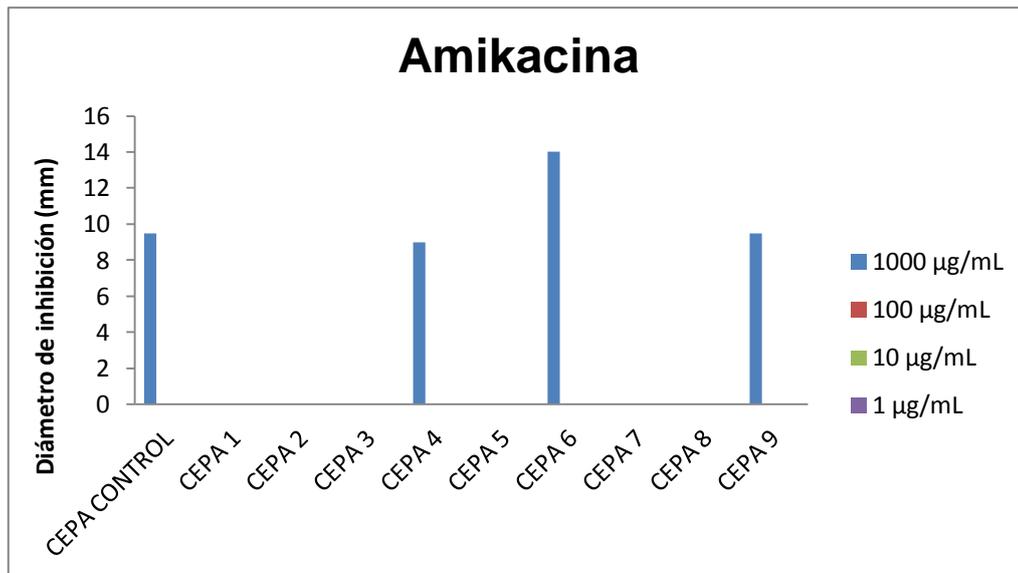


**Figura 13:** Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico ceftazidima.

Sólo la cepa control presentó inhibición a 1000 µg/mL del antibiótico ceftazidima, con un diámetro de 9 mm. Las otras dos cepas necesitaron de concentraciones superiores a los 1000 µg/mL para ser inhibidas.

★ **Amikacina.**

A continuación se muestra la figura 14 con la CMI de la amikacina para cada cepa:



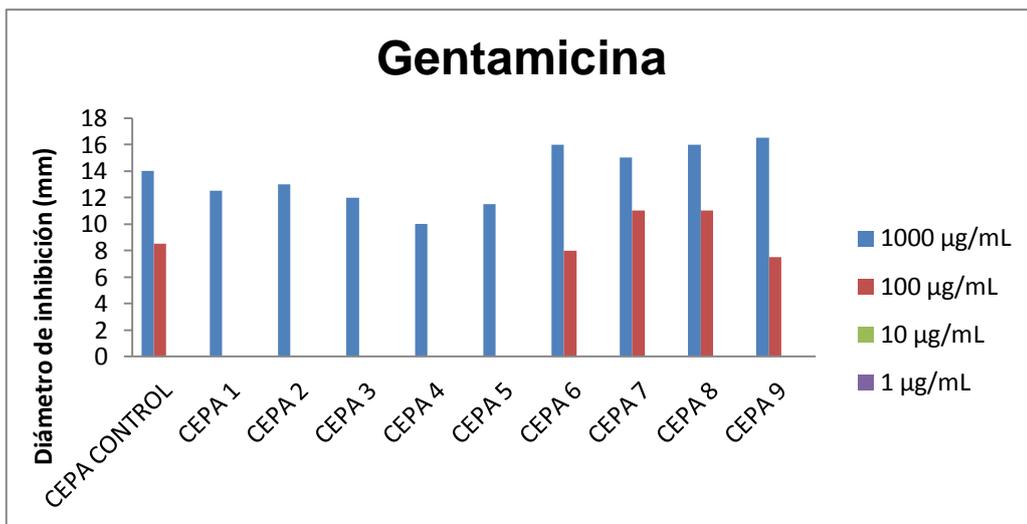
**Figura 14:** Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico amikacina.

La cepa control y las cepas 4, 6 y 9 presentaron una CMI de 1000 µg/mL, siendo la más susceptible la cepa 6 con diámetro de inhibición de 14 mm. El resto de las cepas necesitan una concentración mayor de 1000 µg/mL para ser inhibidas.

Estos datos difieren con lo obtenido por Liu y col. en el 2009 los cuales reportaron una CMI para la amikacina de 32- 250 µg/mL.

★ **Gentamicina.**

La figura 15 muestra las CMI de la gentamicina para cada cepa:



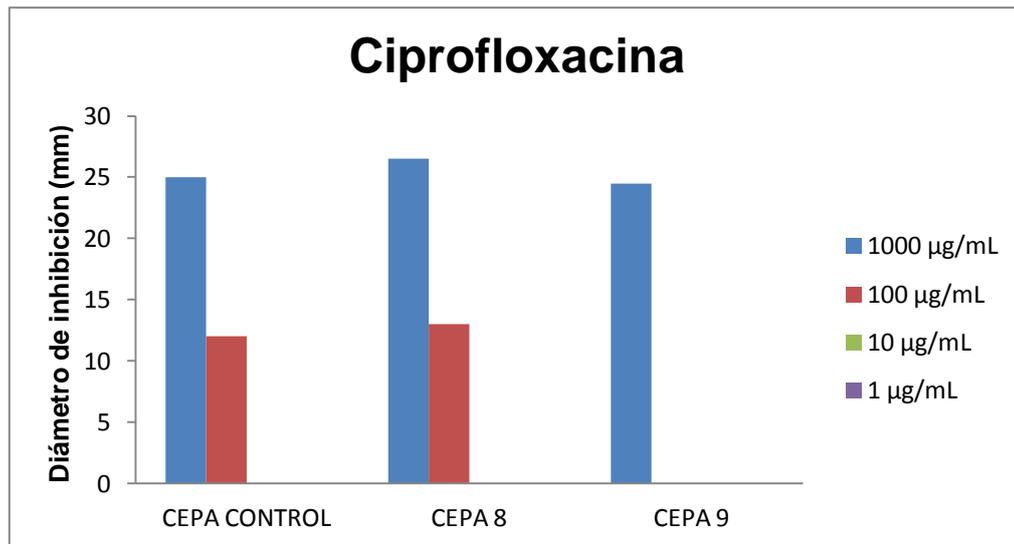
**Figura 15:** Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico gentamicina.

Todas las cepas necesitaron de concentraciones de 100 µg/mL o mayores para poder ser inhibidas. La cepa que presentó mayor susceptibilidad fue la cepa 8 con un diámetro de inhibición de 10,5 mm. La más resistente fue la cepa 4 con un diámetro de inhibición de 10 mm y una CMI de 1000 µg/mL.

Estos datos difieren con lo reportado con Liu y col. en el 2009, los cuales obtuvieron CMI inferiores a 24 µg/mL para el 80% de las cepas. El 20% restante si coinciden ya que obtuvieron CMI de 250 µg/mL.

★ **Ciprofloxacina.**

La CMI de la ciprofloxacina se presenta en la siguiente figura para cada cepa:



**Figura 16:** Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico ciprofloxacina.

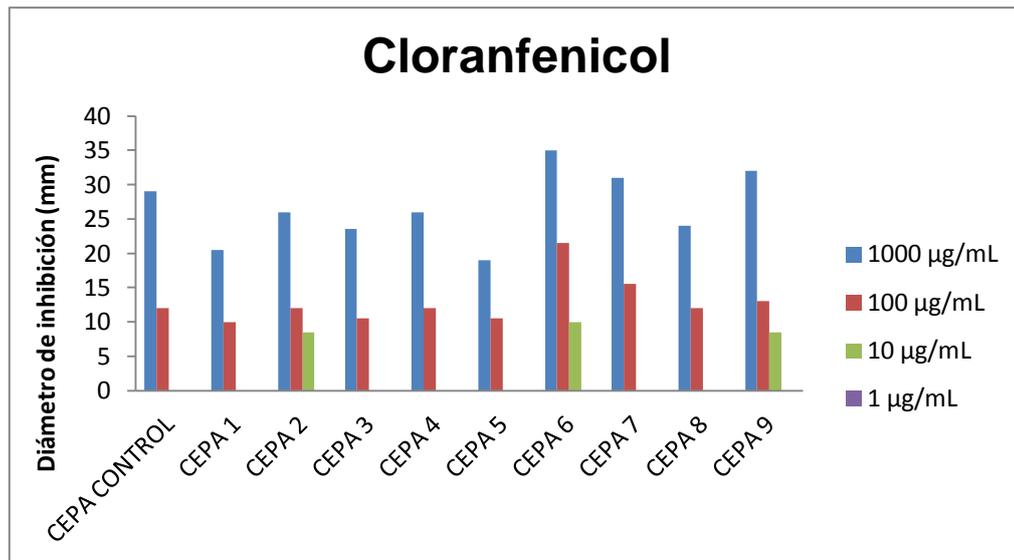
Únicamente tres cepas fueron susceptibles a este antibiótico con el método de disco difusión. De estas tres cepas, la 9 presenta la mayor resistencia con una CMI de 1000 µg/mL y un diámetro de inhibición de 24,5 mm. La cepa 8 fue la que presentó mayor susceptibilidad con un diámetro de inhibición de 13 mm y una CMI de 100 µg/mL.

Estos datos difieren con lo reportado con Liu y col. en el 2009, los cuales obtuvieron una CMI de 32 µg/mL para este antibiótico.

También Pan y col. en el 2011, reportaron una CMI baja de 8-64 µg/mL para la ciprofloxacina, lo que indica una susceptibilidad mayor a la obtenida en este estudio.

#### ★ Cloranfenicol.

A continuación se muestra la figura 17 con la CMI del cloranfenicol para cada cepa:



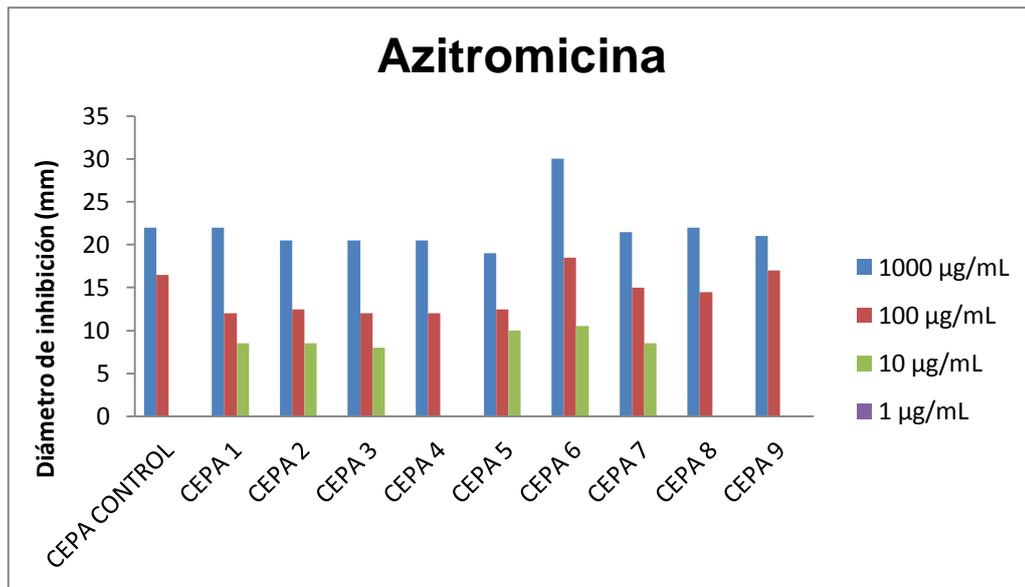
**Figura 17:** Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico cloranfenicol.

Las cepas 2, 6 y 9 fueron las únicas que presentaron inhibición a 10 µg/mL, siendo la más susceptible la cepa 6 con un diámetro de inhibición de 10,5 mm. La más resistente fue la cepa 1 con una CMI de 100 µg/mL y un diámetro de inhibición de 10 mm.

A diferencia de estos resultados, Mora y García reportaron una CMI de 100 µg/mL en el 100% de las cepas estudiadas. Así mismo Belén y col. en el 2005, reportaron una CMI baja de 4 µg/mL para las 38 cepas ensayadas.

★ **Azitromicina.**

En la siguiente figura se muestran las CMI de la azitromicina para cada cepa:



**Figura 18:** Diámetros de inhibición de las cepas a 4 concentraciones diferentes del antibiótico azitromicina.

La cepa control y las cepas 8 y 9 fueron las que presentaron mayor resistencia con una CMI de 100 µg/mL (30%). El resto de las cepas (60%) obtuvieron una CMI de 10 µg/mL, siendo la más susceptible la cepa 6 con un diámetro de inhibición de 10,5 mm.

Estos datos coinciden con lo reportado por Mora y García (2007), los cuales obtuvieron una CMI de 10 µg/mL para un 65% de las cepas. El otro 35% obtuvo una CMI de 100 µg/mL.

Ninguno de los antibióticos evaluados causó en las cepas inhibición a una concentración de 1 µg/mL. Todas las cepas necesitan de una concentración de 10 µg/mL o más de estos antibióticos para ser inhibidas.

En el anexo 9.3 se muestran todos los diámetros de los halos de inhibición para cada una de las cepas a las cuatro diferentes concentraciones ensayadas para los 9 antibióticos.

A continuación se muestra la tabla 18 con las CMI de cada antibiótico para las 9 cepas evaluadas y para la cepa control:

**Tabla 18:** CMI de cada antibiótico en las 9 cepas.

Cepa	CMI de cada antibiótico (µg/mL)								
	Amox	Amik	Gen	Cip	Amp	Pen	Clo	Cef	Azi
Control	10	1000	100	100	100	100	1000	1000	10
1	100	>1000	1000	/	100	100	100	/	10
2	100	>1000	1000	/	100	1000	10	/	10
3	100	>1000	1000	/	100	100	100	/	10
4	100	1000	1000	/	100	100	100	/	100
5	100	>1000	1000	/	100	100	100	/	10
6	10	1000	100	/	10	100	10	/	10
7	10	>1000	100	/	10	100	100	/	10
8	10	>1000	100	100	10	100	100	>1000	100
9	10	1000	100	1000	10	100	10	>1000	100

(/): no se evaluó la CMI; Amox: amoxicilina/ácido clavulánico; Amik: amikacina; Gen: gentamicina; Cip: ciprofloxacina; Amp: ampicilina; Pen: penicilina; Clo: cloranfenicol; Cef: ceftazidima; Azi: azitromicina.

El 50% de las cepas presentaron una CMI de 10 µg/mL para la amoxicilina/ácido clavulánico, el otro 50% presentaron CMI de 100 µg/mL. Para la amikacina se obtuvo una CMI del 10 µg/mL para el 40% de las cepas, el 60% restante presentó una CMI de >1000 µg/mL.

La gentamicina por su parte, obtuvo una CMI de 1000 µg/mL en el 50% de las cepas, y 100 µg/mL en el 50% restante. La ciprofloxacina sólo se evaluó en la cepa control y en las cepas 8 y 9, ya que las otras cepas presentaron resistencia por el método de disco difusión. Este antibiótico causó una CMI de

100 µg/mL en la cepa control y en la cepas 8. La cepa 9 obtuvo una CMI de 1000 µg/mL.

La ampicilina causó una CMI de 10 µg/mL en el 40% de las cepas, y 100 µg/mL en el 60% de las cepas restantes, mientras que la penicilina obtuvo una CMI de 100 µg/mL en el 90% de las cepas. Sólo la cepa 2 obtuvo una CMI de 1000 µg/mL.

Por su parte el cloranfenicol causó en el 30% de las cepas una CMI de 10 µg/mL, el otro 60% obtuvo una CMI de 100 µg/mL y el 10% restante obtuvo una CMI de 1000 µg/mL.

La ceftazidima se evaluó sólo en 3 cepas obteniéndose una CMI de 1000 µg/mL y mayor a 1000 µg/mL, y por último la azitromicina causó una CMI de 10 µg/mL en el 70% de las cepas y 100 µg/mL en el 30% de las cepas restantes.

## **5.5 Análisis de resultados.**

### **Comparación de los resultados obtenidos en la longitud de los halos de inhibición de las diferentes cepas con respecto a la cepa control de *Staphylococcus aureus* (25923).**

A continuación se muestra la tabla 19 con los halos de inhibición de cada cepa y la cepa control con sus respectivas probabilidades:

**Tabla 19:** Probabilidad obtenida por antibiótico de las cepas con respecto a la cepa control.

Ant.	Cepa	Halos de inhibición de las diferentes cepas									P
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Amox	Aislada	33,5	27,5	27,5	32,5	30	32	32,5	32	33	0,0005
	<b>Control</b>	<b>34,5</b>	<b>34,5</b>	<b>34,5</b>	<b>34,5</b>	<b>34,5</b>	<b>34,5</b>	<b>34,5</b>	<b>34,5</b>	<b>34,5</b>	
Amp	Aislada	19,5	19,5	19	20,5	19,5	24	30,5	38,5	24,5	0,0144
	<b>Control</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	
Pen	Aislada	23	22,5	22	22,5	20,5	23,5	31	31,5	30	0,1267
	<b>Control</b>	<b>27,5</b>	<b>27,5</b>	<b>27,5</b>	<b>27,5</b>	<b>27,5</b>	<b>27,5</b>	<b>27,5</b>	<b>27,5</b>	<b>27,5</b>	
Oxa	Aislada	10,5	0	0	8	10,5	10	0	0	0	0,0000
	<b>Control</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	
Cef	Aislada	8	10	8	10	10	6	8,5	22	21,5	0,0000
	<b>Control</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	<b>26</b>	
Amk	Aislada	25,5	26,5	26,5	29	29,5	34,5	30,5	26	26	0,0000
	<b>Control</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	
Gen	Aislada	29,5	27	30	30	27	33	28	27,5	24	0,0000
	<b>control</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	
Tet	Aislada	14	10	11,5	9	9,5	10,5	9,5	12,5	14	0,0555
	<b>Control</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	
Cip	Aislada	7	0	13	10	7	12	11,5	16,5	16	0,0000
	<b>Control</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	
Clo	Aislada	26	29	27	28,5	26	30,5	30	24	23	0,0000
	<b>Control</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	
Azi	Aislada	38	43	40,5	43,5	43,5	43	43,5	37,5	36	0,0000
	<b>Control</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	
Met	Aislada	12	8	9	8	7	15	0	0	0	0,0028
	<b>Control</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	

Ant.: anitibiótico; Amox: amoxicilina/ácido clavulánico; Amp: ampicilina; Pen: penicilina; Oxa: oxacilina; Cef: ceftazidima; Amik: amikacina; Gen: gentamicina; Tet: tetraciclina; Cip: ciprofloxacina; Clo: cloranfenicol; Azi: azitromicina; Met: metronidazol.

Para el antibiótico tetraciclina se obtuvo una  $p \geq 0,05$ , lo que indica que no hay diferencia significativa entre las cepas y la cepa control para este antibiótico.

Para el resto de los antibióticos se obtuvieron probabilidades menores a 0,05, lo que señala que si hay diferencias significativas de las cepas aisladas y la cepa control en todos estos antibióticos.

La cepa control es sólo una medida de comparación con valores estándares ya establecidos, por esto los halos de inhibición en comparación con esta cepa son significativamente diferentes.

**Comparación de los resultados obtenidos en la longitud de los halos de inhibición de las diferentes cepas de *Pediococcus pentosaceus* entre sí.**

A continuación se muestra la tabla 20 con los halos de inhibición de las 6 cepas de *Pediococcus pentosaceus* para cada antibiótico y la probabilidad obtenida:

**Tabla 20:** Diámetro de inhibición de las 6 cepas de *Pediococcus pentosaceus* con su respectiva probabilidad.

Antibióticos	Halos de inhibición de las diferentes cepas (mm)						P
	1	2	3	4	5	6	
Amox./ác. Cla.	33,5	27,5	27,5	32,5	30	32	0,9681
Ampicilina	19,5	19,5	19	20,5	19,5	24	
Penicilina	23	22,5	22	22,5	20,5	23,5	
Oxacilina	10,5	0	0	8	10,5	10	
Ceftazidima	8	10	8	10	10	6	
Amikacina	25,5	26,5	26,5	29	29,5	34,5	
Gentamicina	29,5	27	30	30	27	33	
Tetraciclina	14	10	11,5	9	9,5	10,5	
Ciprofloxacina	7	0	13	10	7	12	
Cloranfenicol	26	29	27	28,5	26	30,5	
Azitromicina	38	43	40,5	43,5	43,5	43	
Metronidazol	12	8	9	8	7	15	

Amox./ác. Cla.: amoxicilina/ácido clavulánico.

La probabilidad obtenida fue de 0,9681 ( $p \geq 0,05$ ), con lo que se acepta la hipótesis nula planteada, es decir, que no hay diferencias significativas entre los halos de inhibición de las 6 cepas de *Pediococcus pentosaceus* aislados.

Esto probablemente se debe al hecho de que todas las cepas de esta especie pertenecen al mismo grupo de bacterias ácido lácticas, y por ello parecen presentar un comportamiento similar frente a los antibióticos.

## 6. CONCLUSIONES

- ★ Se halló un título para las BAL de  $10^7$  UFC/gr para la muestra de salchichón, y de  $10^6$  UCF/gr para la muestra de chorizo; lo cual concuerda con el valor esperado para los productos cárnicos fermentados, cuyas poblaciones oscilan entre  $10^4$ - $10^9$  UFC/gr.
  
- ★ Se logró identificar 9 cepas de bacterias ácido lácticas, encontrándose la prevalencia de las siguientes especies: *Pediococcus pentosaceus* (66,6%), *Lactobacillus brevis* (22,2%) y *Leuconostoc mesenteroides/dextranicum* (11,1%). los cuales son comunes en este tipo de producto.
  
- ★ Se obtuvo un 100% de susceptibilidad en los antibióticos amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina, amikacina, gentamicina, cloranfenicol y azitromicina. Para la penicilina se obtuvo un 90% de susceptibilidad y para la ceftazidima se obtuvo un 30% de susceptibilidad. Para los antibióticos oxacilina, tetraciclina y metronidazol se obtuvo un 100% de resistencia. Dado que de estos antibióticos la ceftazidima, oxacilina y tetraciclina causan una resistencia adquirida, resulta preocupante la posible transferencia a la flora patógena que se encuentran en los alimentos y en la flora intestinal.
  
- ★ El 100% de las cepas de BAL y la cepa control fueron multirresistentes, es decir, que presentaron resistencia a más de un antibiótico. Esta situación

complicaría aún más el riesgo de transmisión de los genes de resistencia a los microorganismos patógenos y/o oportunistas.

- ★ Se obtuvo concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 10 µg/mL, 100 µg/mL y 1000 µg/mL en las diferentes cepas evaluadas.
  
- ★ No se encontró diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) todas las especies de *Pediococcus pentosaceus*; posiblemente porque el grupo comparten características similares.

## 7. RECOMENDACIONES

- ★ Se recomienda realizar la identificación de un número mayor de cepas de bacterias ácido lácticas, a través de las galerías API o de técnicas moleculares, para proceder a la evaluación de la susceptibilidad antibiótica.
- ★ Por otro lado sería importante ampliar el rango de concentraciones de los antibióticos para determinar la CMI en cepas con elevada resistencia.
- ★ Asimismo, sería importante caracterizar e identificar los genes de resistencia u otros factores que confiera la resistencia adquirida por estas bacterias ácido lácticas.
- ★ Por último se recomienda seguir realizando trabajos de investigación relacionados con el comportamiento de las BAL frente a diversos antibióticos, debido a la posible transferencia de genes de resistencia a los microorganismos patógenos y oportunistas.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- ★ Academia del área de plantas piloto de alimentos (A.A.P.P.A.) 2004. Introducción a la tecnología de alimentos. Segunda edición. Editorial Limusa, S.A. México.
- ★ Alais, C. 2003. Ciencia de la leche: Principios de técnica lechera. Cuarta edición. Editorial Reverte S.A España.
- ★ Bacus, J., Brown, W. 1985. The lactobacilli: meat products. In: Bacterial starter cultures for foods. *Gilliland S. E.* ed. **5**: 58-72.
- ★ Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., Turk, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol.* **45**: 493-496.
- ★ Belén, A., Delgado, S., Mayo, B. 2005. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Microbiol.* **51**: 51-58.
- ★ Bello, J. 2005. Calidad de vida, alimentos y salud humana: fundamentos científicos. Ediciones Díaz de Santos, Primera edición. España.
- ★ BioMerieux. 2002. Ficha técnica de referencia para utilizar API 50 CHL. Pp 1-2
- ★ BioMerieux. 2002. Ficha técnica de referencia para utilizar API 50 CHL Medium. Pp 1-2.
- ★ Cabrera, C., Gómez, R., Zúñiga, A. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb Med.* **38**: 149-158.
- ★ Clinical and Laboratory standards institute (CLSI). 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. Wayne, Pennsylvania.

- ★ Collado, M. 2004. Caracterización de cepas del género bifidobacterium con carácter probiótico. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- ★ COVENIN, 1993. Norma N° 3006-93. Alimentos. Recuento de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.
- ★ COVENIN, 2000. Norma N° 1410-2000. Salchichón.
- ★ COVENIN, 2000. Norma N° 2700-2001. Chorizo seco.
- ★ Cueto, M., Acuña, Y., Valenzuela, J. 2010. Evaluación In Vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Actu Biol.* **32**: 93-104 Medellín, Colombia.
- ★ CULTIMED. 2003. Manual básico de microbiología. Editorial Panreac Química S.A. Cuarta edición.
- ★ De Ahumada, J., Santana, M., Serrano, J. 2002. Farmacología práctica. Segunda edición. Ediciones Días de santos S.A. España.
- ★ Egervarn, M., Lindmark, H, Roos, S., Huys, G., Lindgren, S. 2006. Effects of Inoculum Size and Incubation Time on Broth Microdilution Susceptibility Testing of Lactic Acid Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **51**: 394-396.
- ★ Flórez, B. 2007. Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo, Asturias, España.
- ★ Garg, A., Sheppard, J., Donnenfel, E., Friedlaender, M. 2007. Tratamiento antibiótico y antiinflamatorio en oftalmología. Tercera edición. Editorial Panamericana. España.

- ★ Geosta, M., López, A. 2001. Manual de industria láctea. Capítulo 4. <http://www.books.google.co.ve/book.manualdeindustriaslacteas>. (Consulta: 15 febrero 2012)
- ★ Gibbs, P. 1987. Novel uses for lactic acid fermentation in food preservation. *J. Appl. Microbiol.* **122**: 295-303.
- ★ Hernández, A. 2003. Microbiología industrial. Primera edición. Editorial UNED.
- ★ Hernández, D. 1988. Evaluación y selección de cultivos lácticos para su potencial uso en la elaboración de queso blanco pasteurizado. Tesis de licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
- ★ Hernández, P., Rodríguez, J., Cintas, L., Moreira, W., Sobrino, O., Fernández, M., Sanz, B. 1993. Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. *Microbiología SEM.* **9**: 37-48.
- ★ Herreros, M., Sandoval, H., González, L., Castro, J., Fresno, J., Tornadijo, M. 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiol.* **22**: 455-459.
- ★ Hummel, A., Hertel, C., Holzappel, W., Franz, C. 2007. Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microb.* **73**: 730-739.
- ★ Ingraham, J., Ingraham, C. 1998. Introducción a la microbiología, volumen 2. Editorial REVERTÉ, S.A., Primera edición, Barcelona, España.
- ★ Ivette, L., Lei, V., Jensen, L. 2007. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to

- antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **121**: 217-224.
- ★ Jay, J. 2002. Microbiología moderna de los alimentos. Cuarta Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
  - ★ Karapetkov, N., Georgieva, R., Rumyan, N., Karaivanova, E. 2011. Antibiotic susceptibility of different lactic acid bacteria strains. *Beneficial Microbes.* **4**: 335-339.
  - ★ Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G. 2007. Antimicrobial susceptibilities of Lactobacillus, Pediococcus and Lactococcus human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Rev Col Cienc Pec.* **59**: 900-912.
  - ★ Kushiro, A., Chervaux, C., Cools, S., Perony, A., Legrain, S., Obis, D., Onoue, M., Moer, A. 2009. Antimicrobial susceptibility testing of lactic acid bacteria and bifidobacteria by broth microdilution method and Etest. *Int. J. Food Microbiol.* **132**: 54-58.
  - ★ León, V., Totosaus, A., Guerrero, I., Perez, M. 2006. Efecto de bacteria ácido lácticas termorresistentes en salchichas cocidas. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **5**: 135-141.
  - ★ Liu, C., Yang, Z., Dong, K., Yuan, J., Guo, X. 2009. Antibiotic Resistance of Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Marketed Foods and Drugs. *Int. J. Food Microbiol.* **22**: 401-412.
  - ★ Macfaddin, J. 2000. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica panamericana. Tercera edición. Madrid, España.

- ★ Martín, B., 2005. Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica. Tesis doctoral. Universidad de Gerona. Gerona, España.
- ★ Masco, L., Van Hoorde, K., Brandt, E., Swings, J., Huys, G. 2006. Antimicrobial susceptibility of Bifidobacterium strains from humans, animals and probiotic products. *Rev Col Cienc Pec.* **58**: 85-94.
- ★ Mathur, S., Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **105**: 281-295.
- ★ Mayrhofer, S., Van Hoek, A., Mair, C., Huys, G., Arts, H., Kneifel, W., Domig, K. 2010. Antibiotic susceptibility of members of the Lactobacillus acidophilus group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. *Int. J. Food Microbiol.* **144**: 81-87.
- ★ Medina, J. 2002. Guía de antimicrobianos y tratamiento de las infecciones. Ediciones Díaz de Santos, S. A. Segunda Edición. Madrid, España.
- ★ Mora, N., García, A. 2007. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas frente a diversos antibióticos. Tesis de Licenciatura. Universidad autónoma del estado de Hidalgo. Pachuca, México.
- ★ Moya, A. 1995. Aprovechamiento de lactosueros por fermentación. Producción de ácido láctico. Tesis doctoral. Universidad Castilla- La Mancha.
- ★ Olivas, E., Alarcón, L. 2001. Manual de prácticas de microbiología básica y microbiología de alimentos. Primera edición. Ciudad Juárez, México.
- ★ Ortiz, M. 2006. Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo. Tesis de

Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, México.

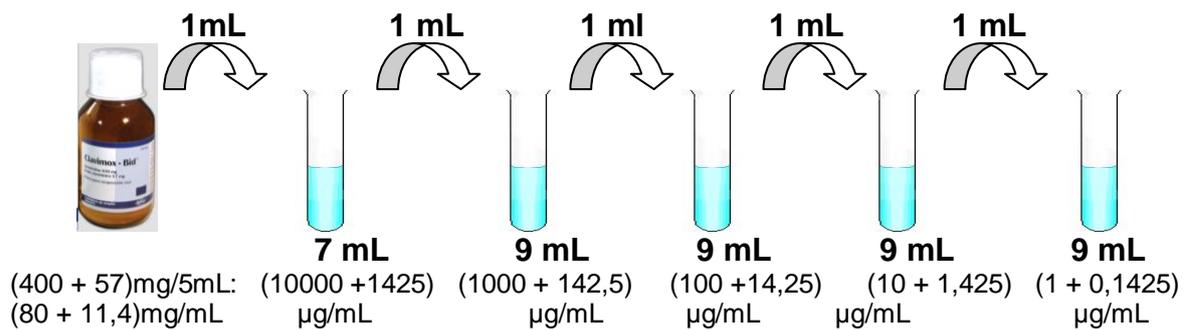
- ★ Paik, H., Bae, S., Park, S., Pan, J. (1997). Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tochigiensis*. *Journal of Industrial Microbiol. And Biotechnol.* **19**: 294-298.
- ★ Pan, L., Hu, X., Wang X. 2011. Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods. *Food Control.* **22**: 1316-1321.
- ★ Parra, R. 2010. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Tesis de Licenciatura. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja, Colombia.
- ★ Ramírez, J., Ulloa, P., Velázquez, M., Ulloa, J., Romero, F. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente.* **7**: 1-16.
- ★ Rodríguez, V., Magro, S. 2008. Bases de la alimentación humana. Primea Edición. Editorial Netbiblo. España.
- ★ Ruíz, J., Ramírez, N., Arroyave, O. 2001. Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquía. *Rev Col Cienc Pec.* **14(2)**:143-154.
- ★ Salim, M., Belén, A., Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* **24**: 559–570.
- ★ Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., Painter, P., 1992. Microbiología. Segunda Edición. Editorial Reverte, S.A. Barcelona, España.

- ★ Stephen, J. 2007. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Primera Edición. Editorial UNED. EEUU.
- ★ Taroco, R., Seija, V., Vignoli, R. 2006. Método de estudio de la sensibilidad antibiótica. Editorial Médica panamericana. Tercera edición. Madrid, España.
- ★ Temmerman, R., Pot, B., Husys, G., Swings, J. 2002. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* **81**: 1-10.
- ★ Toomey, N., Bolton, D., Fanning, S. 2010. Characterization and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Research in Microbiology.* **161**: 127-135.
- ★ Uzcátegui, C. 2012. Aislamiento e identificación de *Salmonella* resistente a antibióticos en muestras de pollo recolectadas en expendios comerciales. Tesis de licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- ★ Vanegas, M., Correa, N., Morales, A., Martínez, A., Rúgeles, L., Jiménez, F. 2009. Resistencia a antibióticos de bacterias aisladas de biopelículas en una planta de alimentos. *Rev.MVZ Córdoba.* **14(2)**:1677-1683.

## 9. Anexos

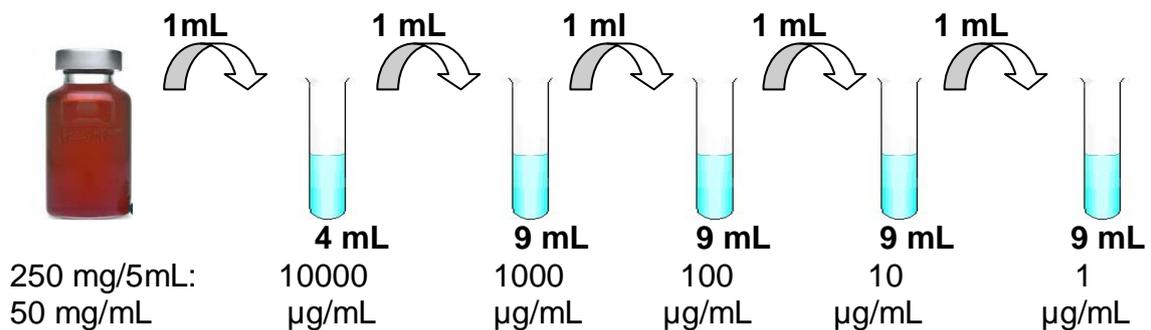
### 9.1 Diluciones realizadas para obtener concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . de cada antibiótico para realizar la prueba de concentración mínima inhibitoria.

#### ★ Amoxicilina/ácido clavulánico.



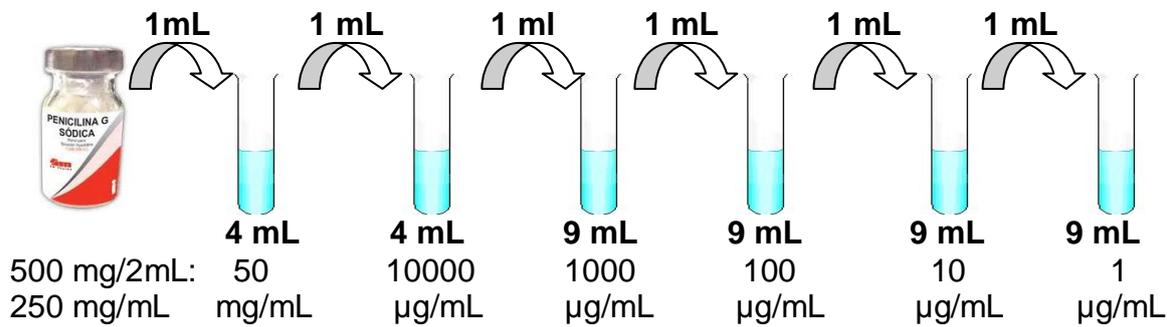
**Figura 19:** Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico amoxicilina/ácido clavulánico con una concentración inicial de (400 + 57) mg/5mL.

#### ★ Ampicilina.



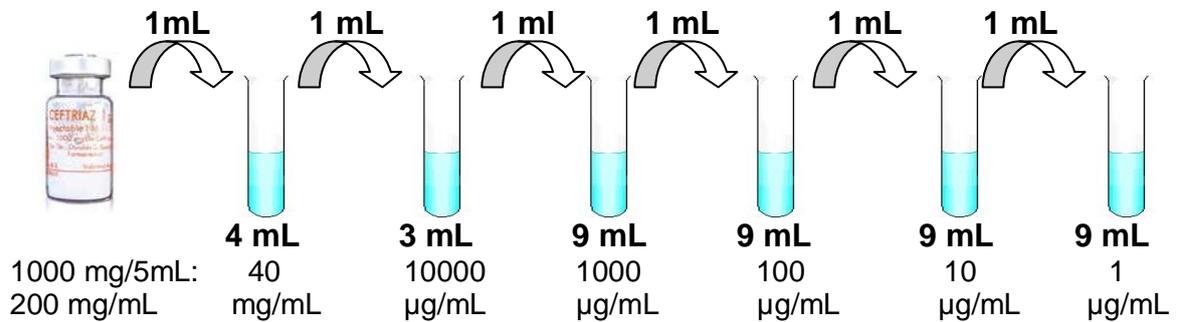
**Figura 20:** Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico ampicilina con una concentración inicial de 250 mg/5mL.

★ **Penicilina.**



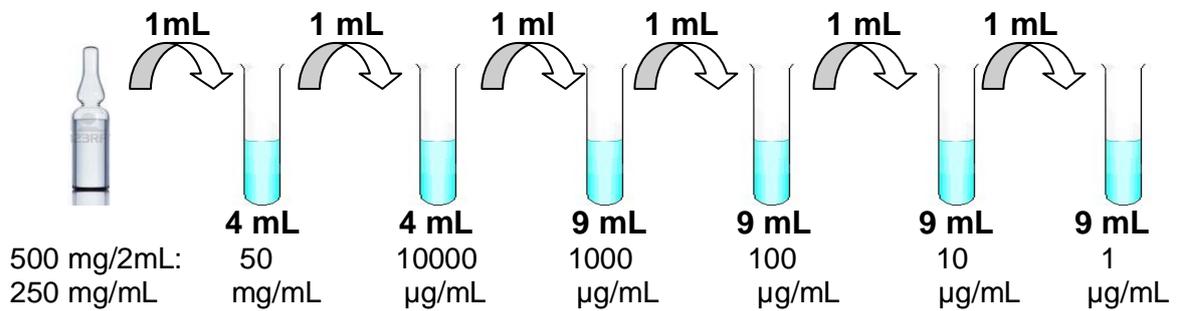
**Figura 21:** Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico penicilina con una concentración inicial de 500 mg/2 mL.

★ **Ceftazidima.**



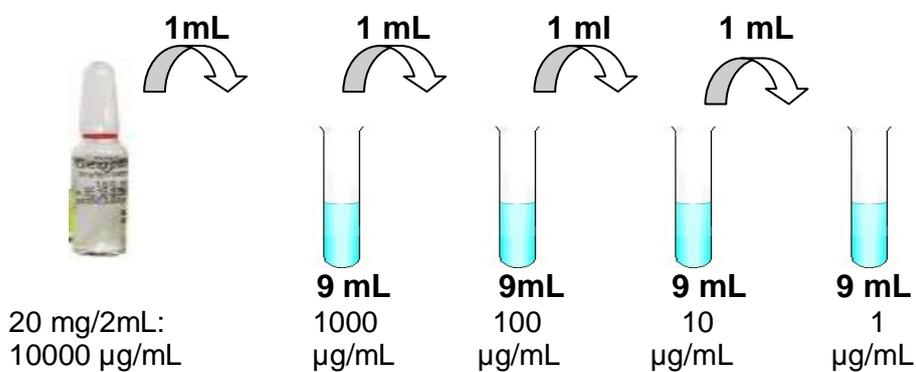
**Figura 22:** Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico ceftazidima con una concentración inicial de 1000 mg/5 mL.

★ Amikacina.



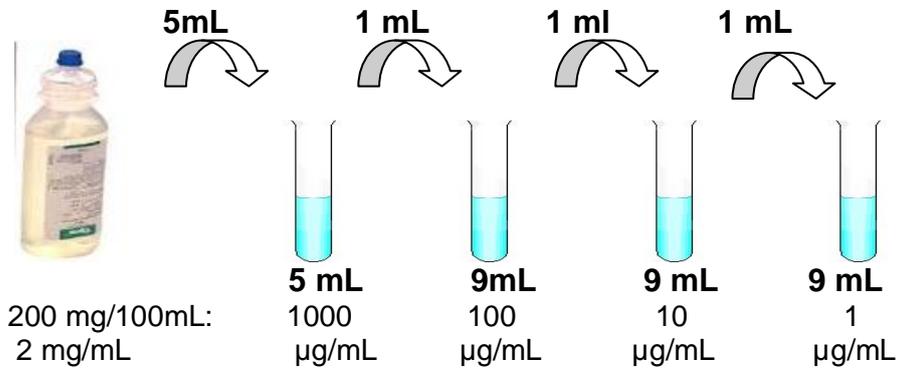
**Figura 23:** Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico amikacina con una concentración inicial de 500 mg/2 mL.

★ Gentamicina.



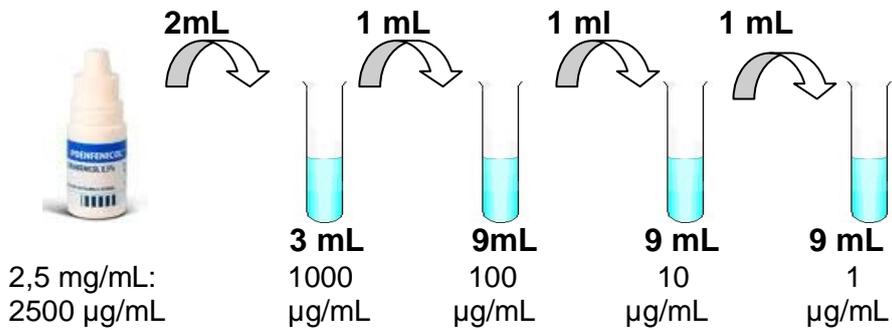
**Figura 24:** Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico gentamicina con una concentración inicial de 20 mg/2 mL.

★ Ciprofloxacina.



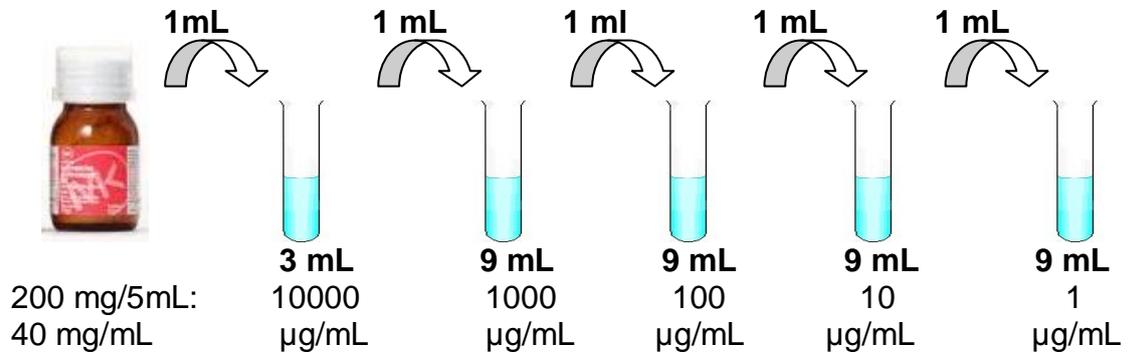
**Figura 25:** Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico ciprofloxacina con una concentración inicial de 200 mg/100 mL.

★ Cloranfenicol.



**Figura 26:** Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico cloranfenicol con una concentración inicial de 2500 µg/ mL.

★ Azitromicina.



**Figura 27:** Esquema de las diluciones realizadas para el antibiótico azitromicina con una concentración inicial de 200 mg/5mL.

9.2 CMI de cada cepa para los antibióticos que causaron la clasificación de sensible e intermedio.

★ Amoxicilina/ácido clavurónico.

CEPA 1 (CMI 100µg/mL)



CEPA 2 (CMI 100µg/mL)



CEPA 3 (CMI 100µg/mL)



CEPA 4 (CMI 100µg/mL)



CEPA 5 (CMI 100µg/mL)



CEPA 6 (CMI 10µg/mL)



CEPA 7 (CMI 10µg/mL)



CEPA 8 (CMI 10µg/mL)



CEPA 9 (CMI 10µg/mL)



CEPA CONTROL (CMI 10µg/mL)

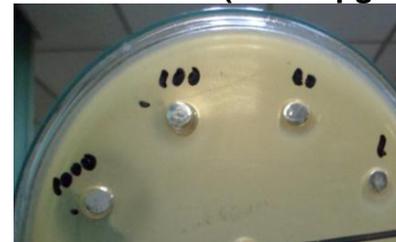


Figura 28: CMI de todas las cepas para el antibiótico amoxicilina/ácido clavurónico.

★ Ampicilina.

CEPA 1 (CMI 100µg/mL)



CEPA 2 (CMI 100µg/mL)



CEPA 3 (CMI 100µg/mL)



CEPA 4 (CMI 100µg/mL)



CEPA 5 (CMI 100µg/mL)



CEPA 6 (CMI 10µg/mL)



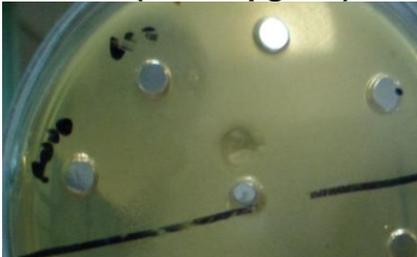
CEPA 7 (CMI 10µg/mL)



CEPA 8 (CMI 10µg/mL)



CEPA 9 (CMI 10µg/mL)



CEPA CONTROL (CMI 100µg/mL)



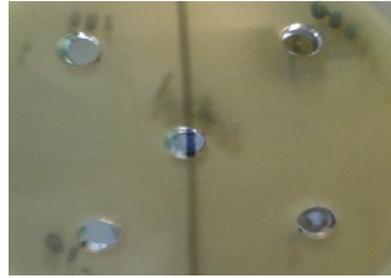
Figura 29: CMI de todas las cepas para el antibiótico ampicilina.

★ Penicilina.

CEPA 1 (CMI 100µg/mL)



CEPA 2 (CMI 1000µg/mL)



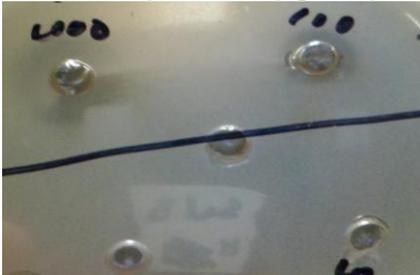
CEPA 3 (CMI 100µg/mL)



CEPA 4 (CMI 100µg/mL)



CEPA 5 (CMI 100µg/mL)



CEPA 6 (CMI 100µg/mL)



CEPA 7 (CMI 100µg/mL)



CEPA 8 (CMI 1000µg/mL)



CEPA 9 (CMI 100µg/mL)



CEPA CONTROL (CMI 100µg/mL)

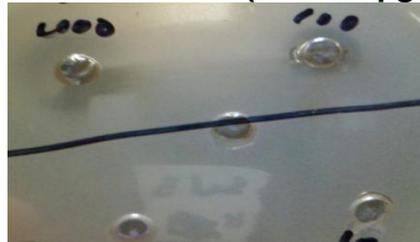
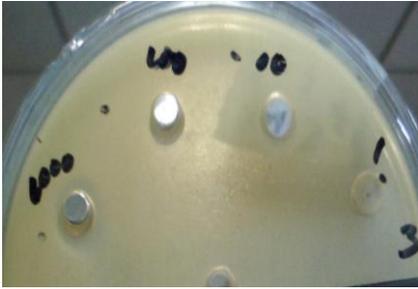


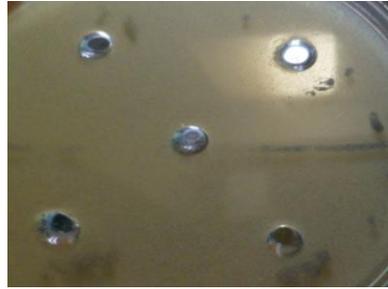
Figura 30: CMI de todas las cepas para el antibiótico penicilina.

★ Ceftazidima.

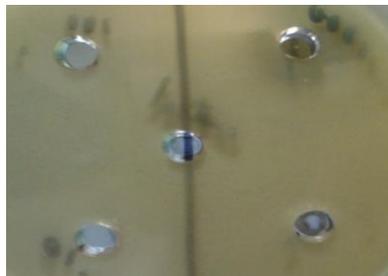
CEPA 8 (CMI  $>1000\mu\text{g/mL}$ )



CEPA 9 (CMI  $>1000\mu\text{g/mL}$ )



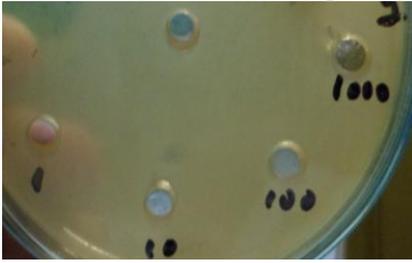
CEPA CONTROL (CMI  $1000\mu\text{g/mL}$ )



**Figura 31:** CMI de todas las cepas para el antibiótico ceftazidima.

★ Amikacina.

CEPA 1 (CMI >1000µg/mL)



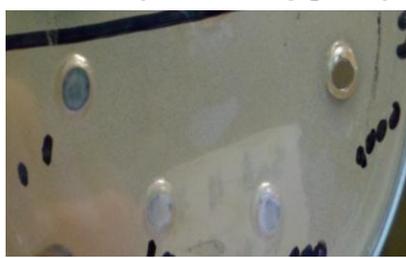
CEPA 2 (CMI >1000µg/mL)



CEPA 3 (CMI >1000µg/mL)



CEPA 4 (CMI 1000µg/mL)



CEPA 5 (CMI >1000µg/mL)



CEPA 6 (CMI 1000µg/mL)



CEPA 7 (CMI >1000µg/mL)



CEPA 8 (CMI >1000µg/mL)



CEPA 9 (CMI 1000µg/mL)



CEPA CONTROL (CMI 1000µg/mL)



Figura 32: CMI de todas las cepas para el antibiótico amikacina.

★ Gentamicina.

CEPA 1 (CMI 1000µg/mL)



CEPA 2 (CMI 1000µg/mL)



CEPA 3 (CMI 1000µg/mL)



CEPA 4 (CMI 1000µg/mL)



CEPA 5 (CMI 1000µg/mL)



CEPA 6 (CMI 100µg/mL)



CEPA 7 (CMI 100µg/mL)



CEPA 8 (CMI 100µg/mL)



CEPA 9 (CMI 100µg/mL)



CEPA CONTROL (CMI 100µg/mL)

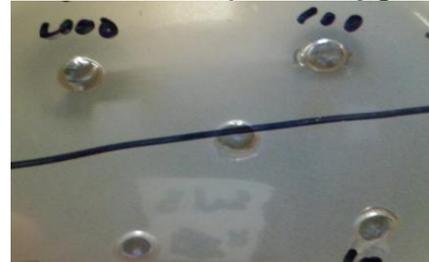
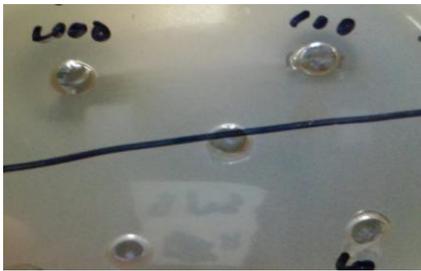


Figura 33: CMI de todas las cepas para el antibiótico gentamicina.

★ Ciprofloxacina.

CEPA 8 (CMI 100µg/mL)



CEPA 9 (CMI 1000µg/mL)



CEPA CONTROL (CMI 100µg/mL)



**Figura 34:** CMI de todas las cepas para el antibiótico ciprofloxacina.

★ Cloranfenicol.

CEPA 1 (CMI 100µg/mL)



CEPA 2 (CMI 10µg/mL)



CEPA 3 (CMI 100µg/mL)



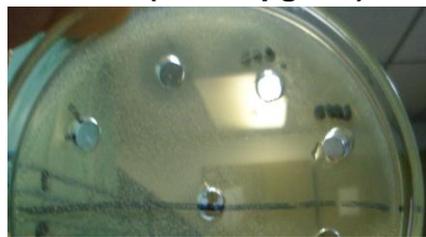
CEPA 4 (CMI 100µg/mL)



CEPA 5 (CMI 100µg/mL)



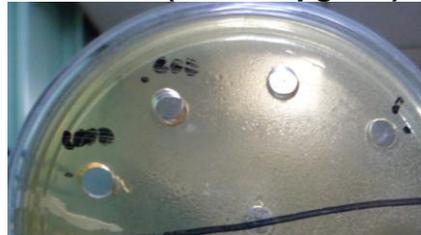
CEPA 6 (CMI 10µg/mL)



CEPA 7 (CMI 100µg/mL)



CEPA 8 (CMI 100µg/mL)



CEPA 9 (CMI 10µg/mL)



CEPA CONTROL (CMI 10µg/mL)



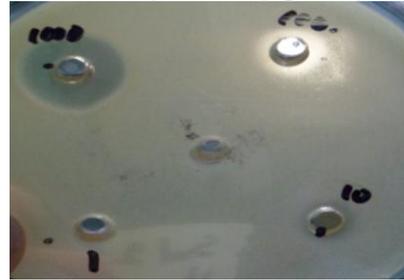
Figura 35: CMI de todas las cepas para el antibiótico cloranfenicol.

★ Azitromicina.

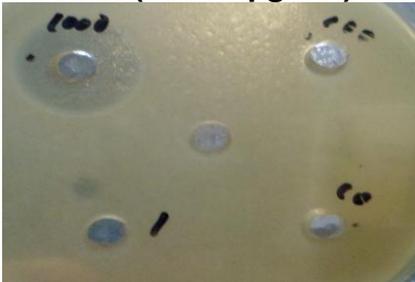
CEPA 1 (CMI 10µg/mL)



CEPA 2 (CMI 10µg/mL)



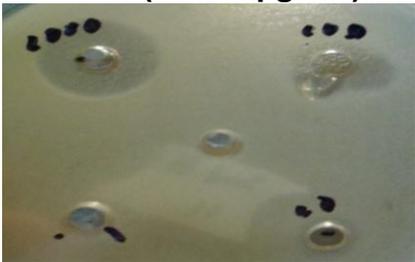
CEPA 3 (CMI 10µg/mL)



CEPA 4 (CMI 100µg/mL)



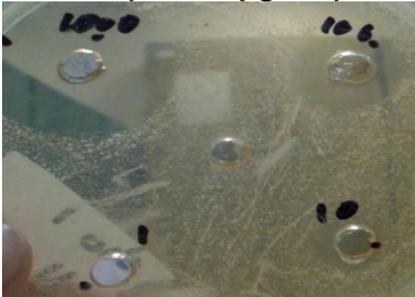
CEPA 5 (CMI 10µg/mL)



CEPA 6 (CMI 10µg/mL)



CEPA 7 (CMI 10µg/mL)



CEPA 8 (CMI 100µg/mL)



CEPA 9 (CMI 100µg/mL)



CEPA CONTROL (CMI 100µg/mL)



Figura 36: CMI de todas las cepas para el antibiótico azitromicina.

### 9.3 Diámetro de los halos de inhibición por cada concentración para la detección de la CMI por cepa.

**Tabla 21:** Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa control.

Concentración del antibiótico (µg/mL)	Halo de inhibición por antibiótico (mm)							
	Amox	Amik	Gen	Cip	Amp	Clo	Cef	Azi
1000	27	9,5	14	25	30	29	9	22
100	16,5	0	8,5	12	17,5	12	0	17
10	9	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0

Amox: amoxicilina/ácido clavulánico; Amik: amikacina; Gen: getamicina; Cip: ciprofloxacina; Amp: ampicilina; Clo: cloranfenicol; Cef: ceftazaidima; Azi: azitromicina.

**Tabla 22:** Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 1.

Concentración del antibiótico (µg/mL)	Diámetro de inhibición por antibiótico (mm)						
	Amox	Amik	Gen	Amp	Pen	Clo	Azi
1000	24,5	0	12,5	23	21	21	22
100	15,5	0	0	15	9,5	10	12
10	0	0	0	0	0	0	8,5
1	0	0	0	0	0	0	0

Amox: amoxicilina/ácido clavulánico; Amik: amikacina; Gen: getamicina; Amp: ampicilina; Pen: penicilina; Clo: cloranfenicol; Azi: azitromicina.

**Tabla 23:** Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 2.

Concentración del antibiótico (µg/mL)	Halo de inhibición por antibiótico (mm)						
	Amox	Amik	Gen	Amp	Pen	Clo	Azi
1000	21,5	0	13	21	18	26	21
100	15	0	0	15	0	12	13
10	0	0	0	0	0	8,5	8,5
1	0	0	0	0	0	0	0

Amox: amoxicilina/ácido clavulánico; Amik: amikacina; Gen: getamicina; Amp: ampicilina; Pen: penicilina; Clo: cloranfenicol; Azi: azitromicina.

**Tabla 24:** Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 3.

Concentración del antibiótico (µg/mL)	Halo de inhibición por antibiótico (mm)						
	Amox	Amik	Gen	Amp	Pen	Clo	Azi
1000	23	0	12	24	19,5	24	21
100	15,5	0	0	13	11	11	12
10	0	0	0	0	0	0	8
1	0	0	0	0	0	0	0

Amox: amoxicilina/ácido clavulánico; Amik: amikacina; Gen: getamicina; Amp: ampicilina; Pen: penicilina; Clo: cloranfenicol; Azi: azitromicina.

**Tabla 25:** Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 4.

Concentración del antibiótico (µg/mL)	Halo de inhibición por antibiótico (mm)						
	Amox	Amik	Gen	Amp	Pen	Clo	Azi
1000	21	9	10	25	18	26	21
100	13	0	0	14	10	12	12
10	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0

Amox: amoxicilina/ácido clavulánico; Amik: amikacina; Gen: getamicina; Amp: ampicilina; Pen: penicilina; Clo: cloranfenicol; Azi: azitromicina.

**Tabla 26:** Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 5.

Concentración del antibiótico (µg/mL)	Halo de inhibición por antibiótico (mm)						
	Amox	Amik	Gen	Amp	Pen	Clo	Azi
1000	21	0	11,5	24	14,8	19	19
100	13,5	0	0	15	12	11	13
10	0	0	0	0	0	0	10
1	0	0	0	0	0	0	0

Amox: amoxicilina/ácido clavulánico; Amik: amikacina; Gen: getamicina; Amp: ampicilina; Pen: penicilina; Clo: cloranfenicol; Azi: azitromicina.

**Tabla 27:** Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 6.

Concentración del antibiótico (µg/mL)	Halo de inhibición por antibiótico (mm)						
	Amox	Amik	Gen	Amp	Pen	Clo	Azi
1000	37,5	14	16	36	34,5	35	30
100	27,5	0	8	24	23,5	22	19
10	14	0	0	9	0	10	11
1	0	0	0	0	0	0	0

Amox: amoxicilina/ácido clavulánico; Amik: amikacina; Gen: getamicina; Amp: ampicilina; Pen: penicilina; Clo: cloranfenicol; Azi: azitromicina.

**Tabla 28:** Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 7.

Concentración del antibiótico (µg/mL)	Halo de inhibición por antibiótico (mm)						
	Amox	Amik	Gen	Amp	Pen	Clo	Azi
1000	30,5	0	15	31	22	31	22
100	22,5	0	11	24	10,5	16	15
10	11,5	0	0	9,5	0	0	8,5
1	0	0	0	0	0	0	0

Amox: amoxicilina/ácido clavulánico; Amik: amikacina; Gen: getamicina; Amp: ampicilina; Pen: penicilina; Clo: cloranfenicol; Azi: azitromicina.

**Tabla 29:** Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 8.

Concentración del antibiótico (µg/mL)	Halo de inhibición por antibiótico (mm)								
	Amox	Amik	Gen	Cip	Amp	Pen	Clo	Cef	Azi
1000	37,5	0	16	27	30	32	24	0	22
100	25	0	11	13	21	20	12	0	14,5
10	13,5	0	0	0	9,5	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Amox: amoxicilina/ácido clavulánico; Amik: amikacina; Gen: getamicina; Cip: ciprofloxacina; Amp: ampicilina; Pen: penicilina; Clo: cloranfenicol; Cef: ceftazidima; Azi: azitromicina.

**Tabla 30:** Diámetro de inhibición para cada concentración de la cepa 9.

Concentración del antibiótico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Halo de inhibición por antibiótico (mm)								
	Amox	Amik	Gen	Cip	Amp	Pen	Clo	Cef	Azi
1000	31,5	9,5	16,5	25	31	27	32	0	21
100	23,5	0	7,5	0	22	21	13	0	17
10	13	0	0	0	9	0	8,5	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Amox: amoxicilina/ácido clavulánico; Amik: amikacina; Gen: getamicina; Cip: ciprofloxacina; Amp: ampicilina; Pen: penicilina; Clo: cloranfenicol; Cef: ceftazaidima; Azi: azitromicina.