



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Microbiología e Inmunología

*“Actividad antimicrobiana
in vitro y caracterización
de metabolitos secundarios
producidos por cepas de
Lactococcus, Pediococcus y
Leuconostoc aisladas de
residuos de cervecería”*

PRAMPARO ROMINA DEL PILAR

Trabajo final de grado

Directora: Dra. Barberis Lucila

2018



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Microbiología e Inmunología

*“Actividad antimicrobiana
in vitro y caracterización
de metabolitos secundarios
producidos por cepas de
Lactococcus, Pediococcus y
Leuconostoc aisladas de
residuos de cervecería”*

PRAMPARO ROMINA DEL PILAR

Trabajo final de grado

Directora: Dra. Barberis Lucila

Río Cuarto - Córdoba

20 de Abril de 2018

El presente trabajo se llevó a cabo siguiendo el reglamento de la asignatura Trabajo Final (código 2149), para la Carrera de Microbiología, avalado por el Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico- Químicas y Naturales. Se realizó durante los años 2016 y 2018 en el laboratorio de Bacteriología, ubicado en el Departamento de Microbiología e Inmunología, perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Físico- Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

ALUMNA: Romina del Pilar Pramparo _____

DIRECTORA: Dra. Lucila Barberis _____

JURADOS: Dra. Lucila Barberis _____

Dr. Matías Pellegrino _____

Mg. Daniela Lombardo _____

*« Confianza y fe viva
mantenga el alma,
que quien cree y espera
Todo lo alcanza »*

Santa Teresa de Jesús

AGRADECIMIENTOS

- A mi familia y amigos, por todo el amor, la paciencia y el apoyo incondicional que recibí durante estos años.
- A todo el equipo de Bacteriología por cederme el espacio, los medios y conocimientos necesarios para realizar mi trabajo final.
- A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por la posibilidad de estudiar esta carrera y formarme profesionalmente.

4.2.	Objetivos específicos.....	24
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1.	Cepas de bacterias ácido lácticas utilizadas y condiciones de cultivo.....	25
5.2.	Cepas de bacterias indicadoras utilizadas y condiciones de cultivo.....	26
5.3.	Actividad antimicrobiana de cepas de <i>Lactococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp. y <i>Leuconostoc</i> spp. sobre diferentes microorganismos patógenos.....	27
5.3.1.	Técnica de estrías cruzadas.....	27
5.4.	Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes sin tratar y neutralizados de bacterias ácido lácticas sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> mediante la técnica de difusión en pozos	27
5.5.	Caracterización de las sustancias antimicrobianas producidas por <i>Lactococcus lactis</i> B87, <i>Pediococcus acidilactici</i> B82 y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B19 sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica serotipo O157:H7	28
5.5.1.	Evaluación de la sensibilidad a enzimas proteolíticas de los metabolitos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas	28
5.5.2.	Evaluación de la sensibilidad a elevadas temperaturas de los metabolitos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas	28
5.5.3.	Evaluación de la estabilidad a diferentes valores de pH de los metabolitos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas	29
5.5.4.	Evaluación de sensibilidad al tratamiento con urea de los metabolitos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas	29
5.6.	Modo de acción de los metabolitos antimicrobianos producidos por <i>Lactococcus lactis</i> B87, <i>Pediococcus acidilactici</i> B82 y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B19 sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica serotipo O157:H7	30
5.7.	Análisis estadísticos	31
5.8.	Medios de cultivo.....	31
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1.	Reaislamiento y confirmación de la identidad de las bacterias ácido lácticas	33
6.2.	Reaislamiento y confirmación de la identidad de los microorganismos indicadores.....	35
6.2.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	35
6.2.2.	<i>Listeria monocytogenes</i>	35

6.2.3.	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp. y <i>Shigella</i> spp.....	36
6.3.	Actividad antimicrobiana de cepas de <i>Lactococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp. y <i>Leuconostoc</i> spp. sobre diferentes microorganismos patógenos.....	36
6.3.1.	Técnica de estrías cruzadas	36
6.4.	Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes sin tratar y neutralizados de bacterias ácido lácticas sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> mediante la técnica de difusión en pozos	44
6.5.	Caracterización de las sustancias antimicrobianas producidas por <i>Lactococcus lactis</i> B87, <i>Pediococcus acidilactici</i> B82 y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B19 sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica serotipo O157:H7	48
6.5.1.	Evaluación de la sensibilidad a enzimas proteolíticas de los metabolitos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas	48
6.5.2.	Evaluación de la sensibilidad a elevadas temperaturas de los metabolitos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas	50
6.5.3.	Evaluación de la estabilidad a diferentes valores de pH de los metabolitos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas	51
6.5.4.	Evaluación de sensibilidad al tratamiento con urea de los metabolitos antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas.....	53
6.6.	Modo de acción de los metabolitos antimicrobianos producidos por <i>Lactococcus lactis</i> B87, <i>Pediococcus acidilactici</i> B82 y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B19 sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica serotipo O157:H7	54
7.	CONCLUSIONES.....	57
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
9.	ANEXO ESTADÍSTICO	75

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Principales mecanismos de acción de los microorganismos probióticos a nivel intestinal	10
Figura 2: Mecanismo de formación de poros de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas	21
Figura 3: Coloración de Gram de <i>Lactococcus lactis</i> B87, <i>Pediococcus acidilactici</i> B82 y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B19 (1000x).....	33
Figura 4: Coloración de Gram de un cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> (1000x).....	35
Figura 5: Halos de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> producidos por diferentes bacterias ácido lácticas.....	40
Figura 6: Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento de diferentes cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> producidos por los sobrenadantes puros y neutralizados de <i>Lactococcus lactis</i> B87, <i>Pediococcus acidilactici</i> B82 y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B19 mediante la técnica de difusión en pozos.....	44
Figura 7: Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento de diferentes cepas de <i>Escherichia coli</i> producidos por los sobrenadantes puros y neutralizados de <i>Lactococcus lactis</i> B87, <i>Pediococcus acidilactici</i> B82 y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B19 mediante la técnica de difusión en pozos.....	46
Figura 8: Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento de diferentes cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> producidos por los sobrenadantes puros y neutralizados de <i>Lactococcus lactis</i> B87, <i>Pediococcus acidilactici</i> B82 y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B19 mediante la técnica de difusión en pozos	47
Figura 9: Halos de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> LAMA 543 producidos por el SLCN de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B19 puro, diluido al medio y al cuarto tratado con tripsina, y su respectivo control sin tratar	49
Figura 10: Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por los sobrenadantes libres de células de <i>Lactococcus lactis</i> B87, <i>Pediococcus acidilactici</i> B82 y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B19 sometidos a diferentes tratamientos térmicos.....	50

Figura 11: Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por los sobrenadantes neutralizados de <i>Lactococcus lactis</i> B87, <i>Pediococcus acidilactici</i> B82 y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B19 tratados con urea al 1% y sus respectivos controles sin tratar.	53
Figura 12: Efecto de las bacteriocinas producidas por <i>Lactococcus lactis</i> B87, <i>Pediococcus acidilactici</i> B82 y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B19 sobre <i>Escherichia coli</i> O157:H7	55
Figura 13: Efecto de las bacteriocinas producidas por <i>Lactococcus lactis</i> B87, <i>Pediococcus acidilactici</i> B82 y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B19 sobre <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	56
Tabla 1: Clasificación de bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas	19
Tabla 2: Pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos indicadores.....	26
Tabla 3: Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Lactococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp. y <i>Leuconostoc</i> spp.....	34
Tabla 4: Patrones de fermentación de hidratos de carbono para bacterias ácido lácticas	34
Tabla 5: Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	35
Tabla 6: Pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias	36
Tabla 7: Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas sobre distintas cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> mediante la técnica de estrías cruzadas.....	37
Tabla 8: Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas sobre dos cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante la técnica de estrías cruzadas	38
Tabla 9: Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas sobre diferentes cepas de <i>Escherichia coli</i> mediante la técnica de estrías cruzadas.....	39
Tabla 10: Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas sobre dos cepas de <i>Salmonella</i> spp. mediante la técnica de estrías cruzadas	41
Tabla 11: Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas sobre dos cepas de <i>Shigella</i> spp. mediante la técnica de estrías cruzadas	42

Tabla 12: Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por bacterias ácido lácticas sobre diferentes microorganismos indicadores mediante la técnica de estrías cruzadas	43
Tabla 13: Halos de inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> O157: H7 producidos por los SLCN de BAL tratados con tripsina y sin tratar mediante la técnica de difusión en pozos	48
Tabla 14: Actividad antimicrobiana de sustancias bioactivas producidas por bacterias ácido lácticas incubadas a diferentes valores de pH durante 5 y 15 horas	52

1. Resumen

1. RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo heterogéneo de microorganismos que comparten la característica de producir de ácido láctico como principal producto de la fermentación de azúcares. Entre los distintos géneros que constituyen este grupo se puede mencionar a *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Oenococcus* spp., *Enterococcus* spp, entre otros. Las BAL están ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose comúnmente en alimentos, aguas residuales, materiales vegetales, y formando parte de la microbiota de humanos y animales. Muchos miembros de este grupo son reconocidos generalmente como seguros (GRAS) y presentan presunción calificada de seguridad (QPS), lo cual los define como microorganismos no patógenos seguros para la salud. Las BAL han sido ampliamente estudiadas en los últimos años, especialmente por su capacidad de competir con otros microorganismos por nutrientes, degradar micotoxinas y producir una gran variedad de compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, entre otros. Las bacteriocinas son metabolitos secundarios de naturaleza proteica que presentan actividad antimicrobiana sobre especies relacionadas o no filogenéticamente, pudiendo ejercer un efecto bacteriostático o bactericida. Dado que las BAL son microorganismos seguros, la mayoría de sus metabolitos también son considerados como seguros y presentan propiedades tecnológicas interesantes para su potencial aplicación en la industria alimenticia y farmacéutica, así como también en la medicina humana y veterinaria. El objetivo de este trabajo fue caracterizar las sustancias con actividad antimicrobiana producidas por cepas de *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. aisladas de residuos de cervecería. La actividad antimicrobiana producida por las BAL en estudio se determinó mediante la técnica de estrías cruzadas, utilizando como microorganismos indicadores diferentes cepas de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. El efecto inhibitorio de los sobrenadantes libres de células (SLC) y SLC neutralizados (SLCN) de las BAL sobre *S. aureus* y *E. coli* se evaluó realizando la técnica de difusión en pozos. Para la caracterización de los metabolitos antimicrobianos los sobrenadantes fueron expuestos a temperaturas de 121 °C durante 10 min y 100 °C durante 60 min, ajustados a diferentes valores de pH (2- 11), tratados con tripsina (1 mg/ml) y con urea (1%). Luego, se determinó la actividad de los sobrenadantes tratados y sin tratar utilizando la técnica de difusión en pozos sobre *E. coli* O157:H7. El modo de acción de las bacteriocinas presentes en los SLCN de las BAL se evaluó adicionando los mismos a un cultivo de *E. coli* O157:H7 que fue incubado durante 72 horas y se realizaron mediciones de DO a 600 nm y recuento de células viables a distintos intervalos. Posteriormente, se construyeron las curvas de crecimiento. La técnica de estrías cruzadas permitió comprobar que las cepas de BAL

estudiadas presentaron actividad antimicrobiana sobre todas las bacterias Gram positivas y Gram negativas estudiadas, mostrando halos promedio de inhibición que oscilaron entre 16,42 y 27,75 mm. Los SLC de las BAL produjeron halos promedio de inhibición comprendidos entre 23,50 y 29,00 mm. Al neutralizar los SLC la actividad antimicrobiana se mantuvo, indicando que los metabolitos responsables de la mayor inhibición no fueron ácidos orgánicos. El tratamiento con tripsina eliminó la acción biológica de los SLCN, demostrando que las sustancias antimicrobianas producidas por las BAL en estudio poseen naturaleza proteica, que es una de las características más importantes de las bacteriocinas. Las sustancias tipo bacteriocinas de las BAL estudiadas fueron resistentes a elevadas temperaturas, no perdieron actividad cuando se trataron con urea y fueron estables en un amplio rango de pH comprendido entre 2 y 11. Con respecto al modo de acción, el metabolito similar a bacteriocina producido por *L. mesenteroides* B19 presentó un modo de acción bacteriostático sobre *E. coli* O157:H7, mientras que los producidos por *L. lactis* B87 y *P. acidilactici* B82 demostraron un efecto bactericida sobre el mismo microorganismo indicador. En conclusión, en este trabajo se demostró que las cepas de BAL estudiadas presentaron actividad antimicrobiana sobre todos los microorganismos patógenos ensayados. Esta capacidad inhibitoria se debe en su mayoría a la producción de sustancias del tipo bacteriocinas, que fueron resistentes a elevadas temperaturas y diferentes valores de pH.

2. Introducción

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) abarcan un grupo taxonómicamente heterogéneo de microorganismos. Son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, inmóviles, ácido tolerantes y tienen como característica metabólica común la producción de ácido láctico como principal producto final de la fermentación de carbohidratos (Papadimitriou y col., 2016). Los miembros de este grupo son anaerobios aerotolerantes, presentando un desarrollo óptimo en condiciones de microaerofilia o anaerobiosis y carecen de enzimas catalasa y citocromo oxidasa. Presentan requerimientos nutricionales complejos como aminoácidos, péptidos, bases de nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos (Mokoena, 2017). Muchos géneros bacterianos componen este grupo, entre los cuales se pueden citar *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Oenococcus* spp. y *Enterococcus* spp.

Las BAL obtienen su energía a través de la fermentación de carbohidratos. Según la vía metabólica que utilizan para ello y sus distintos productos finales se clasifican en homofermentadoras obligadas, heterofermentadoras facultativas y heterofermentadoras obligadas (Anjum y col., 2014; Sauer y col., 2017). Las especies homofermentadoras obligadas sólo metabolizan hexosas a través de la vía de Embden Meyerhof Parnas (EMP) o glucólisis y liberan ácido láctico como único producto de fermentación (Gänzle, 2015). Las bacterias heterofermentadoras facultativas también metabolizan las hexosas a ácido láctico a través de la vía EMP. Sin embargo, en presencia de cantidades limitantes de glucosa, también pueden degradar las pentosas y el gluconato mediante una fosfocetolasa inducible (enzima de la vía pentosa fosfato) produciendo ácido acético, etanol y ácido fórmico. Finalmente, las especies heterofermentadoras obligadas poseen la enzima aldolasa, pero carecen de la fosfocetolasa. Metabolizan pentosas y hexosas exclusivamente a través de la vía del fosfogluconato y producen ácido láctico, etanol (o ácido acético) y CO₂ (Bosma y col., 2017).

Las bacterias de este grupo están ampliamente distribuidas en la naturaleza por su gran versatilidad metabólica. Se encuentran comúnmente en alimentos como carnes fermentadas, frutas y verduras, productos lácteos, cereales, ensilajes y bebidas fermentadas. También se han aislado de aguas residuales y materiales vegetales y se encuentran formando parte de la microbiota del tracto respiratorio, intestinal y genito-urinario de humanos y muchos animales (Kanmani y col., 2013; Mokoena, 2017). Varios miembros de este grupo son reconocidos generalmente como seguros (GRAS: "Generally Regarded As Safe") y presentan presunción calificada de seguridad (QPS: "Qualified

Presumption of Safety”), lo cual los define como microorganismos no patógenos seguros para la salud humana y animal.

Las BAL han sido ampliamente estudiadas en los últimos años, especialmente por su capacidad de competir con otros microorganismos por nutrientes, degradar micotoxinas y producir una amplia variedad de compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, acetoína, peróxido de hidrógeno, biosurfactantes, bacteriocinas, inhibidores de adhesión, entre otros (Mokoena, 2017; Vasiee y col., 2017).

Son utilizadas en la industria alimentaria como cultivos iniciadores en la elaboración de alimentos fermentados y son adicionadas a diversos suplementos dietarios proporcionando beneficios para la salud del consumidor, principalmente por su potencial habilidad para prevenir o curar enfermedades (Martinussen y col., 2013; Douillard y de Vos, 2014). Sus metabolitos naturales pueden utilizarse como agentes biopreservadores para inhibir a microorganismos patógenos y no patógenos causantes de deterioro, prolongando la vida útil de los alimentos y aumentando su seguridad o inocuidad. También pueden contribuir a las características nutricionales y organolépticas de los mismos (Özogul y Hamed, 2017).

Dentro de los géneros bacterianos que componen este grupo, *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. han recibido especial interés en los últimos años, particularmente por que son microorganismos seguros y se ha demostrado que presentan una amplia variedad de aplicaciones.

2.1.1. Características del género *Lactococcus*

El género *Lactococcus* incluye hasta el momento 11 especies. Son cocos Gram positivos esféricos u ovoides que pueden encontrarse solos, de a pares o en cadenas. No forman esporas, son inmóviles, anaerobios facultativos, quimio- organotróficos y presentan un metabolismo homofermentativo (Vos y col., 2009; Yang y col., 2015).

Los miembros de este género son habitantes naturales de plantas, animales y sus productos derivados en donde obtienen fácilmente carbohidratos, aminoácidos, derivados de ácidos nucleicos, ácidos grasos, entre otros compuestos. Son microaerófilos y presentan requerimientos nutricionales complejos y variables. Son mesófilos (crecen en un intervalo de temperatura entre 10- 40 °C) y presentan un mejor desarrollo a valores de pH cercanos a la neutralidad (Vos y col., 2009).

Los lactococos son ampliamente utilizados en la industria como iniciadores de fermentación, especialmente en productos lácteos. Su función principal en las etapas

iniciales es la producción de ácido láctico, y durante la maduración contribuyen al sabor y aroma a través de su acción proteolítica. También aumentan la seguridad alimentaria mediante la síntesis de sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos o alterantes (Sahraoui y col., 2015; Alegría y col., 2016). La producción de exopolisacáridos es común entre las distintas especies del género y representa una característica tecnológica importante ya que contribuye a la textura de algunos alimentos (Vos y col., 2009; Ohba y col., 2016; Porcellato y col., 2016).

Lactococcus lactis es la especie más ampliamente estudiada y utilizada en la fermentación de alimentos, siendo reconocida generalmente como segura (GRAS). Además de conferir sabor a los alimentos, al igual que otras BAL, produce metabolitos antimicrobianos que contribuyen a su conservación (Song y col., 2017). Particularmente, esta especie es reconocida por la producción de nisina, la única bacteriocina aplicada en alimentos y aprobada para su comercialización y uso en más de 50 países (Hwanhlem y col., 2017). También se ha descrito que bajo condiciones aeróbicas puede generar compuestos de oxígeno altamente tóxicos como superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, los cuales juegan un rol en la biopreservación (Vos y col., 2009).

2.1.2. Características del género *Pediococcus*

El género *Pediococcus* incluye actualmente 15 especies. Se caracterizan por ser cocos Gram positivos esféricos, raramente ovoides, que se disponen de manera individual, de a pares o tétradas, especialmente durante el crecimiento exponencial (Vos y col., 2009; Lačanin y col., 2017).

Son microorganismos inmóviles, no formadores de esporas, oxidasa y catalasa negativos (aunque se ha informado que algunas cepas producen una catalasa o pseudocatalasa) y no reducen el nitrato (Vos y col., 2009; Siddegowda y col., 2017). Son quimio- organotróficos, anaerobios facultativos y con un metabolismo homofermentador, ya que sólo producen ácido láctico a partir de glucosa. Los pediococos son acidófilos, con un rango óptimo de pH entre 4,5 y 7; siendo incapaces de crecer a pH 9. Con respecto a su temperatura de crecimiento son microorganismos mesófilos, cuya temperatura óptima varía entre 25- 35 °C, aunque algunas especies tales como *P. acidilactici* son altamente termotolerantes presentando un buen desarrollo hasta alrededor de 50 °C (Vos y col., 2009; Bosma y col., 2017).

Los miembros de este género suelen compartir varias propiedades fisiológicas con *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weissella* ya que a menudo se encuentran en el mismo hábitat, mostrando necesidades de crecimiento similares y respondiendo de la misma manera a determinadas condiciones o compuestos (Vos y col., 2009). Algunas especies

de *Pediococcus* spp. son de importancia económica en la industria de los alimentos y como cultivos iniciadores en procesos de fermentación de leche, productos vegetales, ensilajes, entre otros (Shukla y Goyal, 2013). Son aplicadas en la fermentación de productos cárnicos y bebidas alcohólicas, así como en la elaboración de diversos quesos. Además, se han aislado cepas pediocóccicas de humanos y animales, principalmente del tracto gastrointestinal (Vos y col., 2009).

Las especies más estudiadas del género son *P. pentosaceus* y *P. acidilactici*, las cuales no sólo participan en procesos de fermentación alimentaria sino que también se han descrito algunas cepas con propiedades probióticas (Porto y col., 2017). Se ha identificado una gama de bacteriocinas que junto a los ácidos orgánicos dan lugar a propiedades antagónicas sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Ferguson y col., 2010; Shukla y Goyal, 2013).

2.1.3. Características del género *Leuconostoc*

El género *Leuconostoc* comprende hasta el momento 19 especies. Son cocos Gram positivos pequeños, elipsoidales a esféricos, inmóviles y no formadores de esporas. Pueden presentarse individualmente o de a pares y formar cadenas de longitudes cortas a medias. Son resistentes a vancomicina, catalasa negativos, carecen de citocromos, no presentan verdaderas cápsulas celulares y la mayoría de las especies producen dextranos. Son heterofermentativos y su contenido GC es relativamente bajo (37,5- 38,5 mol%) (Vos y col., 2009; Jeon y col., 2017).

Las especies del género *Leuconostoc* son quimio- organotróficas, fermentadoras obligadas y presentan complejos requerimientos nutricionales como ácido nicotínico, tiamina, biotina y ácido pantoténico (Vos y col., 2009). Se consideran mesófilos psicrotróficos, con una temperatura óptima de crecimiento entre 14- 30 °C (Lyhs y col., 2015). Son anaerobios facultativos, aunque presentan un mejor crecimiento bajo atmósferas reducidas en oxígeno, recomendándose para su cultivo condiciones microaerófilas (CO₂ al 5%) o anaeróbicas. Presentan un desarrollo óptimo a valores de pH cercanos a 6,5 (Vos y col., 2009).

Uno de los medios de cultivo más empleado para su crecimiento es el Man- Rogosa- Sharpe (MRS), que proporciona todos los nutrientes que requieren estos microorganismos. En este medio, las especies de *Leuconostoc* spp. desarrollan luego de 24 a 72 h de incubación observándose suaves, redondas, blanco- grisáceas y con un diámetro inferior a 1 mm (Vos y col., 2009).

En condiciones de microaerofilia, estos microorganismos heterofermentadores convierten la glucosa en lactato, etanol y CO₂ mediante una combinación de las vías hexosa monofosfato y pentosa fosfato. Sin embargo, en presencia de oxígeno las cepas de *L. mesenteroides* usan NADH oxidasas y NADH peroxidasas para regenerar el NAD, produciendo acetato en lugar de etanol y el doble de ATP. Además convierten el citrato en acetato y lactato, aunque a bajos valores de pH pueden producir diacetilo y acetoína a partir del mismo sustrato (Vos y col., 2009).

Los miembros de este género se aíslan comúnmente de alimentos como cereales, frutas, vegetales fermentados, vino, pescado, carnes y productos lácteos en donde juegan un papel importante en varios procesos de fermentación, contribuyendo por ejemplo a las características organolépticas del queso azul, manteca y cremas (Teodoro de Paula y col., 2014; Pujato y col., 2015).

Las cepas de *Leuconostoc* pueden presentar características tecnológicas importantes para su aplicación en la industria alimentaria. Tienen la ventaja de tolerar ciertas condiciones de estrés que a menudo se encuentran a lo largo del procesamiento de los alimentos como bajos valores de pH, elevado contenido de sal y altas temperaturas (Teodoro de Paula y col., 2014). Son capaces de producir dextrano aportando propiedades gelificantes, viscosificantes y texturizantes; compuestos que otorgan sabor y aroma como acetaldehído, diacetilo y acetoína; enzimas lipolíticas y proteolíticas para la maduración de distintos quesos, entre otros (Teodoro de Paula y col., 2014; Kothari y col., 2015).

2.2. Probióticos

Las BAL son los microorganismos más ampliamente estudiados como bacterias probióticas, principalmente porque son seguros y presentan un gran número de propiedades benéficas. La palabra probiótico deriva del griego y significa “a favor de la vida”. De acuerdo a la definición adoptada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), los probióticos son “microorganismos vivos los cuales, al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped” (FAO/WHO, 2001). Son administrados generalmente de forma oral a través de alimentos, medicamentos o suplementos dietéticos (Meybodi y Mortazavian, 2017; Porto y col., 2017).

Dentro de los numerosos beneficios que los microorganismos probióticos ofrecen, se ha demostrado el efecto preventivo o terapéutico de enfermedades infecciosas, entre las que se pueden citar infecciones del tracto respiratorio e infecciones urogenitales, modulación de la microbiota intestinal, prevención de diarreas, alivio de síntomas de intolerancia a lactosa, prevención de ciertos tipos de cáncer, prevención de alergias y

enfermedades atópicas en lactantes. También se ha demostrado un efecto hipocolesterolémico y anti- hipertensivo (Pascual y Barberis, 2011; Rajoka y col., 2016; Linares y col., 2017).

Además, se ha demostrado que los probióticos poseen un impacto muy positivo en la salud y nutrición animal mediante la promoción del crecimiento, importantes mejoras en la eficiencia de la alimentación, prevención de enfermedades infecciosas y regulación del sistema inmune. Por estos motivos, las BAL probióticas representan actualmente una alternativa innovadora en el área de la producción animal (García- Hernández y col., 2016).

2.2.1. Aplicación de probióticos en la producción porcina

La alimentación representa aproximadamente el 70% de los costos en la producción porcina. Como consecuencia, cada vez son más los productores interesados en encontrar materias primas alternativas a las utilizadas comúnmente con el fin de reducir los costos y mejorar los márgenes de ganancia (Asurmendi y col., 2014; Namoco, 2016).

Los residuos de la industria cervecera son tradicionalmente utilizados como pienso para cerdos en la región central de Argentina, ya que se encuentran disponibles en grandes cantidades, presentan un considerable potencial nutricional y bajo costo. Sin embargo, la elevada humedad y contenido de nutrientes en subproductos húmedos como estos conducen a una rápida descomposición y reducción de la vida de almacenamiento debido al desarrollo de bacterias y hongos (Gerbaldo y col., 2011; Asurmendi y col., 2014).

El deterioro de los piensos contaminados por microorganismos constituye un problema a nivel mundial, pudiendo causar olor, sabor o apariencia desagradables. Un aspecto realmente importante es la presencia de especies potencialmente patógenas, que representan un riesgo para la salud animal (Asurmendi y col., 2015). Desde su nacimiento hasta después del destete (período crítico en el que la microbiota inmadura se enfrenta a un cambio abrupto en la dieta), los animales son muy sensibles a la colonización intestinal por microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *Listeria* spp., que producen diarreas y conducen a una reducción del crecimiento de los animales (Chaucheyras- Durand y Durand, 2010; Shokryazdan y col., 2017). La diarrea post- destete es motivo de importantes pérdidas económicas en la industria porcina. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es la principal causa de esta enfermedad, siendo responsable de aproximadamente el 50% de la mortalidad de los cerdos (Ben Lagha y col., 2017).

Los antibióticos han sido ampliamente utilizados para la promoción del crecimiento y la prevención de diarrea en animales de granja, contribuyendo al aumento del rendimiento

en la producción porcina (Dlamini y col., 2017; Pan y col., 2017). Sin embargo, el uso continuo de los mismos conduce a un desequilibrio de la microbiota intestinal y al incremento de la resistencia bacteriana, amenazando la salud de los animales e indirectamente de los seres humanos. Por este motivo, el uso de antibióticos como promotores del crecimiento animal ha sido prohibido en muchos países de la Unión Europea y Japón, y otros como China y Estados Unidos están restringiendo su inclusión en las dietas porcinas (Pérez Guerra y col., 2007; Yang y col., 2015).

Ante esta problemática, existe la creciente necesidad de desarrollar e implementar nuevas prácticas que sean eficaces, seguras y rentables. Entre ellas, se ha sugerido que las BAL probióticas representan una interesante estrategia alternativa al uso de antibióticos, ya sea para la promoción del crecimiento animal como para la prevención de procesos diarreicos (Yang y col., 2015; Asurmendi y col., 2015). En estudios previos realizados por el grupo de investigación de la orientación Bacteriología en la Universidad Nacional de Río Cuarto se evaluó la microbiota de residuos de cervecería destinados a la producción porcina de la zona, aislándose diversos géneros de BAL entre los que se pueden mencionar *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. (Asurmendi y col., 2014).

2.2.2. Criterios de selección para microorganismos probióticos

Para que un determinado microorganismo pueda ser seleccionado como probiótico, es necesario que cumpla con una serie de requisitos preestablecidos. Dentro de los criterios de selección de los microorganismos probióticos se encuentran los siguientes:

1. Deben ser correctamente identificados mediante estudios fenotípicos y genotípicos (Huys y col., 2013).
2. No ser patógenos ni toxigénicos, de carácter GRAS o QPS (Hossain y col., 2017).
3. Presentar mecanismos de resistencia intrínseca a antibióticos que no puedan ser transmitidos a otros microorganismos (Gueimonde y col., 2013).
4. Tener un tiempo corto de multiplicación y poder producirse a gran escala (Tripathi y Giri, 2014; Daliri y Lee, 2015).
5. En los alimentos, deben mantener su viabilidad en las condiciones de producción, distribución y almacenamiento (Silva y col., 2016; Evvie y col., 2017).
6. Deben ser resistentes a la acidez gástrica y a las sales biliares, para llegar viables y en alto número al intestino (Castro- Rodríguez y col., 2015).
7. Ser capaces de adherirse al epitelio intestinal para lograr una colonización efectiva y ejercer sus efectos en interacción con el huésped (Gupta y Sharma, 2017).

8. Producir uno o más efectos benéficos en la salud de humanos o animales (Shewale y col., 2014).
9. Ser capaces de modular el sistema inmune del huésped (Castro- Rodríguez y col., 2015; Wedajo, 2015).
10. Presentar actividad antimicrobiana y antagonista frente a microorganismos potencialmente patógenos (Shokryazdan y col., 2017).

2.2.3. Mecanismos de acción de los microorganismos probióticos

Los microorganismos probióticos ejercen efectos benéficos directos o indirectos en la salud del huésped a través de diferentes mecanismos de acción (figura 1).

Si bien estos mecanismos no han sido completamente dilucidados, entre ellos se pueden mencionar:

1. Exclusión competitiva: se unen a receptores o sitios de unión en la superficie de los enterocitos impidiendo la adhesión y colonización de microorganismos patógenos (Bermudez- Brito y col., 2012; Hemarajata y Versalovic, 2013).

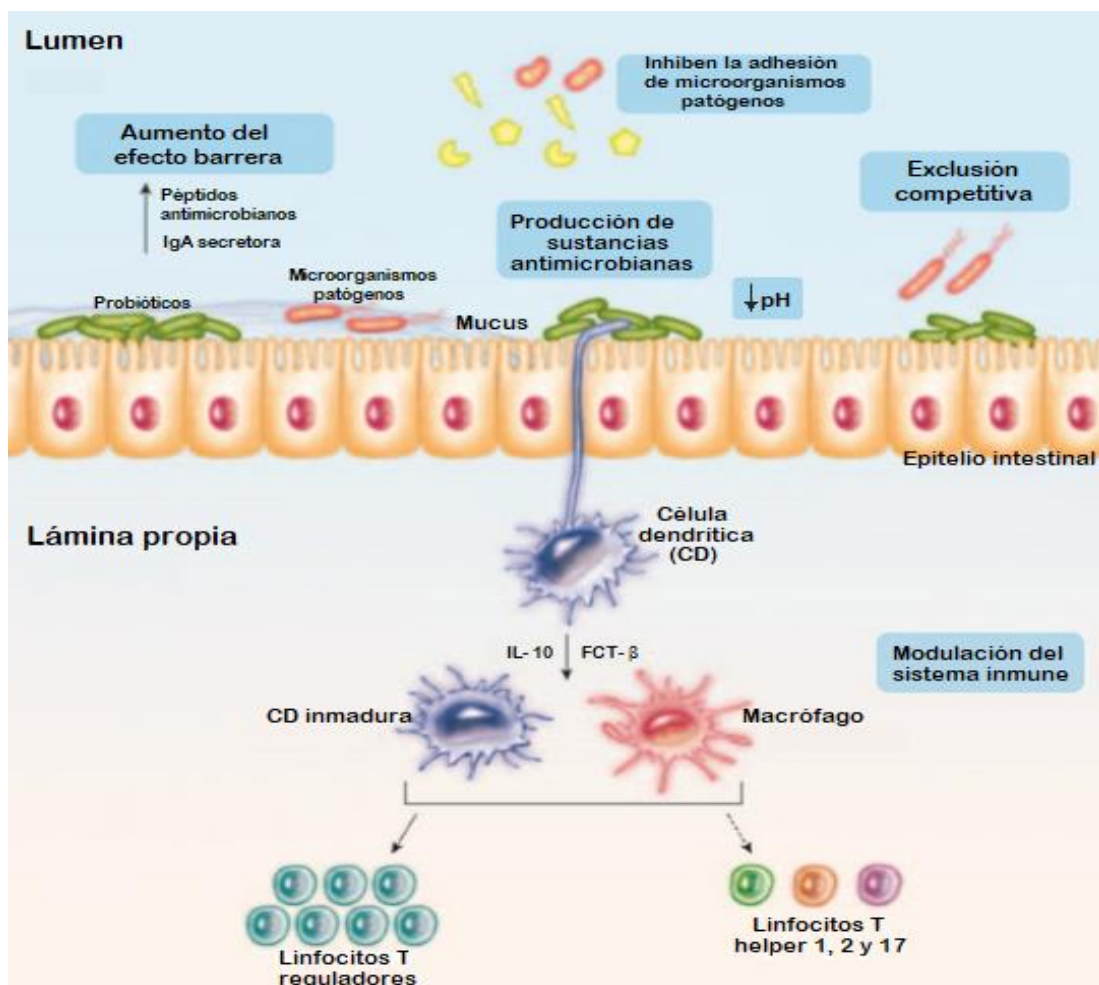


Figura 1: Principales mecanismos de acción de los microorganismos probióticos a nivel intestinal (Bermudez- Brito y col., 2012).

2. Disminución del pH intestinal: la liberación de ácidos orgánicos como producto de su metabolismo fermentativo disminuye el nivel de pH del lumen intestinal inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos (Patel y DuPont, 2015; Shokryazdan y col., 2017).
3. Modulación del sistema inmune: tienen la capacidad de interactuar con células epiteliales y dendríticas (CD), con macrófagos y linfocitos (Bermúdez- Brito y col., 2012). Algunos probióticos pueden ejercer un efecto anti- inflamatorio inhibiendo el factor nuclear κ B (FN- κ B) en los macrófagos, lo que lleva a una disminución de los niveles de interleuquina 8 (IL- 8) evitando el reclutamiento de neutrófilos. También pueden reducir la comunicación entre las CD y los microorganismos patógenos, evitando la activación de las células T CD4+ y la producción de factor de necrosis tumoral α (FNT- α) como respuesta inflamatoria. Otras cepas en cambio, son capaces de activar la respuesta inflamatoria induciendo la producción de FNT- α por las células epiteliales o activando el FN- κ B en los macrófagos y la producción de IL- 8. Pueden también estimular el sistema inmune innato mediante la señalización de las CD, que activan las células T reguladoras e inducen la producción de citoquinas anti- inflamatorias, principalmente interleuquina 10 (IL- 10) y factor de crecimiento transformante β (FCT- β) (Kahouli y col., 2013).
4. Competencia por nutrientes con microorganismos patógenos (Hossain y col., 2017).
5. Aumento del efecto barrera: la función de barrera está dada principalmente por uniones estrechas entre las células del epitelio intestinal. Otro componente importante es el mucus, que contiene péptidos antimicrobianos (como defensinas, lisozima) e IgA secretoria y actúa como una capa protectora impidiendo el contacto directo con los microorganismos presentes en el lumen intestinal (Butel, 2014). Los probióticos pueden actuar a nivel de vías de señalización incrementando la producción de mucina y la secreción de mucus, así como la expresión de proteínas de adherencia tales como E- cadherina y β - catenina que mantienen unidas las células del epitelio intestinal (Bermúdez- Brito y col., 2012; Gogineni y col., 2013). También son capaces de reforzar la integridad de esta barrera inhibiendo la apoptosis de los enterocitos (Gogineni y col., 2013).
6. Producción de sustancias antimicrobianas: este mecanismo de acción se detalla a continuación.

2.2.4. Sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas

La producción de metabolitos antimicrobianos por microorganismos es una característica conservada a lo largo de la evolución, constituyendo un mecanismo eficaz de competencia que les brinda una ventaja adaptativa para la colonización de un nicho

ecológico (Alvarez- Sieiro y col., 2016). Numerosos estudios han revelado la capacidad de las BAL para producir diferentes sustancias con propiedades inhibitorias, principalmente ácidos orgánicos como productos de la fermentación, que acidifican rápidamente el medio impidiendo el crecimiento de otros microorganismos (Stoyanova y col., 2011). También son capaces de producir, en menor cantidad, otros metabolitos como ácidos grasos libres, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas, biosurfactantes, entre otros compuestos. Estas sustancias antagónicas poseen diferente espectro de acción y representan una importante propiedad de las BAL, ya sea como microorganismos probióticos o para su potencial aplicación en la biopreservación de alimentos destinados a consumo humano o animal (Kanmani y col., 2013). A continuación se detallan algunas de estas sustancias y sus principales características.

2.2.4.1. Ácidos orgánicos

Las bacterias ácido lácticas sintetizan diversos ácidos orgánicos como principal producto final de su metabolismo fermentativo (Reis y col., 2012). Son uno de los compuestos antimicrobianos más importantes y mejor caracterizados producidos por las BAL, fundamentalmente el ácido láctico y acético, y en menor medida el ácido benzoico y propiónico (Šušković y col., 2010; Shokryazdan y col., 2017). Estos disminuyen el pH del medio, proporcionando un entorno ácido desfavorable para el crecimiento de otros microorganismos cuyas funciones metabólicas resultan inhibidas (Özogul y Hamed, 2017).

El efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos es causado principalmente por la forma no disociada de la molécula que, al ser lipofílica, difunde a través de la membrana celular hacia el citosol de las células sensibles (Sharma y col., 2014). En el citosol, los ácidos orgánicos se disocian liberando iones hidrógeno y el anión correspondiente. La disminución del pH intracelular interfiere con procesos metabólicos como la glucólisis, el transporte activo celular y la transducción de señales (Šušković y col., 2010; Reis y col., 2012). Cabe mencionar que este modo de acción depende del pH, ya que las formas no disociadas de los ácidos prevalecen cuando el valor de pH del medio es inferior a su constante pKa (Arena y col., 2016).

Se ha demostrado que el efecto antimicrobiano producido por el ácido acético y el ácido propiónico es más eficaz que el del ácido láctico. Esto se debe a que los primeros presentan valores más altos de pKa, por lo tanto, a un determinado pH existirá un mayor porcentaje de moléculas no disociadas de ácido acético y propiónico que de ácido láctico. Finalmente, el ácido acético puede actuar de manera sinérgica con el ácido láctico ya que, según lo explicado, al disminuir el pH del medio aumentaría su toxicidad (Stoyanova y col., 2011; Sharma y col., 2014).

2.2.4.2. Dióxido de carbono

El dióxido de carbono es producido por las BAL con metabolismo heterofermentativo. Este compuesto reemplaza el oxígeno molecular existente creando un ambiente anaeróbico desfavorable para el desarrollo de microorganismos aeróbicos (Šušková y col., 2010; Sharma y col., 2014). La actividad antifúngica del CO₂ se debe a la inhibición de las descarboxilaciones enzimáticas y a su acumulación en la bicapa lipídica de la membrana, lo cual conduce a la disminución su permeabilidad (Šušková y col., 2010).

2.2.4.3. Peróxido de hidrógeno

En presencia de oxígeno, algunas bacterias ácido lácticas son capaces de producir H₂O₂, que puede ser un precursor para la producción de radicales libres bactericidas como el radical superóxido (O⁻²) e hidroxilo (OH⁻) (Stoyanova y col., 2011; Özogul y Hamed, 2017). Su actividad antimicrobiana se atribuye al fuerte efecto oxidante sobre la célula bacteriana, lo que conduce a la peroxidación de lípidos de membrana aumentando su permeabilidad, y a la destrucción de las estructuras moleculares como proteínas y ADN (Shokryazdan y col., 2017). Se sabe que este compuesto por sí solo es bactericida dependiendo de las concentraciones aplicadas y de factores ambientales como el pH y la temperatura (Reis y col., 2012). La producción de H₂O₂ por las BAL resulta eficaz para prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos, y puede ser beneficioso en la conservación de los mismos, ya que inhibe el crecimiento de microorganismos psicrótróficos y patógenos a temperaturas de refrigeración (Reis y col., 2012; Özogul y Hamed, 2017). Además ha sido considerado como uno de los principales metabolitos producidos por las BAL que podría proteger contra las infecciones urogenitales (Šušková y col., 2010).

2.2.4.4. Diacetilo, acetaldehído y acetoína

Las bacterias ácido lácticas heterofermentativas producen acetaldehído por descarboxilación del piruvato. Continuando con esta vía metabólica, el acetaldehído se transforma en α- acetolactato, que es convertido a diacetilo por acción de la enzima α- acetolactato sintasa. Por último, la descarboxilación del α- acetolactato y la reducción de diacetilo dan lugar la acetoína (Šušková y col., 2010). Estos compuestos presentan acción inhibitoria sobre bacterias Gram negativas (como *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia* y *Aeromonas*), Gram positivas (como *Bacillus*) y ciertas levaduras (Stoyanova y col., 2011). Sin embargo, su actividad antimicrobiana es débil, por lo que se requieren elevadas concentraciones para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos, lo cual limita su aplicación en la industria de los alimentos (Šušková y col., 2010). Estos compuestos

son responsables de impartir el aroma y sabor de los productos lácteos fermentados (Parra Huertas, 2010; Gänzle, 2015).

2.2.4.5. Biosurfactantes

Los biosurfactantes son compuestos anfífilos de origen microbiano con elevada actividad superficial y emulsionante. Presentan gran variedad de estructuras químicas, siendo los lipopéptidos los más reportados con actividad antimicrobiana. Su actividad antimicrobiana se debe principalmente a la alteración de la permeabilidad de la membrana celular. Además, los biosurfactantes modifican la hidrofobicidad de las superficies y previenen la adhesión de microorganismos, evitando la formación de biofilms por microorganismos patógenos. La producción de biosurfactantes otorga a las cepas productoras varias funciones fisiológicas como incremento de su capacidad de adhesión, agregación celular y formación de biofilms. Los biosurfactantes producidos por BAL muestran varias ventajas sobre los tensioactivos químicos incluyendo baja toxicidad, mayor biodegradabilidad y eficacia a temperatura y pH específicos. Han recibido gran interés en el campo de la remediación ambiental incluyendo la biorremediación y el lavado y desprendimiento de suelos, así como también en las industrias alimentaria, farmacéutica, petrolera y biomédica (Kanmani y col., 2013).

2.2.4.6. Ácidos grasos

Bajo ciertas condiciones, algunas BAL con actividad lipolítica pueden producir cantidades significativas de ácidos grasos (Sharma y col., 2014). Los ácidos grasos saturados e insaturados presentan actividad antifúngica, la cual depende de la longitud de su cadena y de su concentración. Sin embargo, los ácidos grasos insaturados tienden a ser más activos sobre bacterias Gram positivas que Gram negativas (Desbois y Smith, 2010; Pohl y col., 2011).

La estructura de los ácidos grasos representa un factor importante para su actividad antimicrobiana, ya que varios estudios han demostrado que el grupo - OH del carboxilo cumple un rol significativo en su mecanismo. Si bien su modo de acción aún no se ha dilucidado completamente, se sabe que estos compuestos pueden insertarse en las membranas lipídicas incrementando su fluidez y, en ocasiones, creando poros de tamaños variables. Esto provoca la pérdida de su integridad y, por lo tanto, la liberación descontrolada de electrolitos y proteínas intracelulares que conduce a la desintegración citoplásmica de las células sensibles (Desbois y Smith, 2010; Crowley y col., 2013).

2.2.4.7. Agentes antifúngicos

La capacidad antifúngica de las BAL es una característica descrita en los últimos años. Entre los compuestos con actividad antifúngica descritos se pueden mencionar: dicetopiperazinas, derivados hidroxilados de ácidos grasos, metilhidantoina, mevalonolactona, pentocina TV35b y ácido benzoico (Stoyanova y col., 2011).

2.2.4.8. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana producidos por bacterias que presentan en su estructura un núcleo proteico al cual se le pueden unir otras moléculas como glúcidos, lípidos, ácidos nucleicos y otros. Su espectro de actividad abarca especies relacionadas o no a la cepa productora (Ruiz y col., 2015).

En general estas sustancias se caracterizan por ser moléculas catiónicas, de bajo peso molecular, con una porción hidrofóbica y otra hidrofílica y su origen genético puede ser cromosómico o plasmídico (Zacharof y Lovitt, 2012). Tienen un espectro de actividad muy variado, algunas sólo inhiben el crecimiento de especies similares o estrechamente relacionadas, mientras que otras muestran actividad antimicrobiana sobre una amplia gama de géneros bacterianos. La nisina, la pediocina PA- 1 y la lacticina 3147 por ejemplo, presentan actividad inhibitoria únicamente sobre bacterias Gram positivas (Bakhtiary y col., 2017; O'Bryan y col., 2018), mientras que las bacteriocinas producidas por las cepas *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 se caracterizan por presentar un amplio espectro de actividad que incluye bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras (Pascual y col., 2008a, b; Daniele y col., 2011). Las bacteriocinas también difieren en cuanto a sus propiedades bioquímicas (Mokoena, 2017). Algunas son activas en un amplio rango de pH, mientras que otras sólo son activas en rangos reducidos perdiendo su actividad generalmente a valores extremos (Gautam y col., 2013). Por ejemplo, la bacteriocina producida por *Lactobacillus acidophilus* TSI conserva su actividad antimicrobiana en un rango de pH de 3- 10 (Anjum y col., 2014). En cambio, la mesentericina W3 producida por *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* W3 presenta actividad a valores de pH entre 2 y 7, aunque resulta inactivada en condiciones alcalinas (Dündar y col., 2014). Por estos motivos, la caracterización de estos metabolitos es muy importante para la descripción de nuevas bacteriocinas. La producción de sustancias antimicrobianas, especialmente bacteriocinas, es una característica importante en la selección de cepas probióticas.

Aunque muchas bacteriocinas se han caracterizado y purificado correctamente, es muy común encontrar el acrónimo BLIS (sustancia inhibitoria similar a bacteriocina) para

referirse a aquellas bacteriocinas cuyas secuencias de aminoácidos no han sido esclarecidas hasta el momento (Ruiz y col., 2015).

Las bacteriocinas presentan un fuerte potencial biotecnológico, no sólo en la medicina humana y veterinaria, sino también en la industria farmacéutica y alimenticia. Esto se debe a que presentan propiedades tecnológicas interesantes como su amplia actividad antimicrobiana, baja citotoxicidad sobre células eucariotas, ausencia de resistencia cruzada con antibióticos, no alteran el sabor de los alimentos, son compuestos seguros, entre otros (Ruiz y col., 2015; Alvarez- Sieiro y col., 2016). Actualmente, el uso de bacteriocinas o bacterias productoras de bacteriocinas en la producción animal es un campo con gran potencial de investigación y comercialización. Estas sustancias no solo representan una alternativa a la utilización de antibióticos como promotores del crecimiento, sino que también son muy prometedoras para la prevención y/o como complemento antibiótico de enfermedades infecciosas bacterianas (Pascual y Barberis, 2011; Ben Lagha y col., 2017).

2.2.4.8.1. Clasificación de bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas

Hasta el momento un gran número de bacteriocinas han sido descritas y clasificadas de acuerdo a sus propiedades estructurales, peso molecular y espectro antibacteriano (Kaškonienė y col., 2017; Özogul y Hamed, 2017). Como la investigación en este campo es muy dinámica, las clasificaciones han variado en los últimos años conforme al descubrimiento de nuevas bacteriocinas (Reis y col., 2012). Recientemente, Alvarez-Sieiro y col. (2016) propusieron una clasificación para bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas tomando como base el esquema propuesto por Heng y col. (2007). Esta nueva clasificación divide a las bacteriocinas en 3 clases (tabla 1):

Clase I: pequeños péptidos modificados post- traduccionalmente (menos de 10 kDa)

Esta clase abarca todos los péptidos que experimentan modificación enzimática durante su biosíntesis, dando lugar a moléculas de bajo peso molecular con aminoácidos y estructuras poco comunes que determinan sus propiedades. Se caracterizan por ser estables a elevadas temperaturas (Alvarez- Sieiro y col., 2016; Shokryazdan y col., 2017).

- *Clase Ia o lantipéptidos* (tipos I, II, III y IV): son péptidos que poseen aminoácidos inusuales como lantionina y/o β - metil- lantionina. Según las enzimas implicadas en su maduración se pueden dividir en cuatro tipos y sólo los tipos I y II pueden llamarse lantibióticos, ya que los tipos III y IV no tienen actividad antimicrobiana conocida (Alvarez- Sieiro y col., 2016). La nisina, un lantibiótico tipo I producido principalmente por *Lactococcus lactis*, es la más conocida y mejor caracterizada de

esta clase (Song y col., 2017). La nisina A es la forma originalmente aislada, aunque se han descrito en total ocho variantes naturales de este metabolito: A, Z, F, Q, U, U2, P y H (Woraprayote y col., 2016; Kaškonienė y col., 2017). Esta bacteriocina actúa sobre bacterias Gram positivas estrechamente relacionadas como *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Hwanhlem y col., 2017).

- *Clase Ib o péptidos cíclicos*: son péptidos producidos ribosomalmente y modificados post- traduccionalmente (RiPPs). Poseen actividad antimicrobiana y son sintetizados por bacterias que no se ajustan a ninguna clasificación, a pesar de coincidir con la definición de bacteriocina. Sus extremos N y C terminal se encuentran unidos por un enlace peptídico, formando una molécula circular. Contienen sólo segmentos helicoidales alfa y comparten una estructura similar con un plegado de saposina (Alvarez- Sieiro y col., 2016). Estos péptidos cíclicos poseen un amplio espectro de actividad, estabilidad a elevadas temperaturas y valores extremos de pH, y mayor resistencia a enzimas proteolíticas en comparación a los lineales (Woraprayote y col., 2016). Generalmente ejercen su acción antimicrobiana mediante la alteración de la integridad de la membrana citoplasmática (Ben Lagha y col., 2017).
- *Clase Ic o sactibióticos*: son péptidos que contienen azufre en su carbono α . La estructura de horquilla y los enlaces de azufre son la característica común de este grupo (Mathur y col., 2015; Alvarez- Sieiro y col., 2016).
- *Clase Id o péptidos lineales que contienen azolina*: estos péptidos poseen diversas combinaciones de anillos heterocíclicos de tiazol y metil- oxazol que derivan de residuos de cisteína, serina y treonina. La bacteriocina más estudiada y mejor descrita de este grupo es la estreptolisina S (Alvarez- Sieiro y col., 2016).
- *Clase Ie o glicocinas*: son bacteriocinas que contienen residuos aminoácidos glicosilados. La glicocina F de *Lactobacillus plantarum* fue la primera descrita producida por BAL (Alvarez- Sieiro y col., 2016).
- *Clase If o péptidos de lazo*: son un grupo de RiPPs que presentan un enlace amida entre el primer aminoácido de la cadena peptídica y un residuo cargado negativamente entre las posiciones +7 a +9, formando un anillo que abarca la parte lineal C terminal del polipéptido (Alvarez- Sieiro y col., 2016).

Clase II: bacteriocinas no modificadas (menos de 10 kDa)

Esta clase agrupa bacteriocinas de bajo peso molecular que no contienen modificaciones post- traduccionales. Se caracterizan por ser estables a elevadas temperaturas (Alvarez- Sieiro y col., 2016; Shokryazdan y col., 2017).

- *Clase IIa o bacteriocinas tipo pediocina*: son antimicrobianos de amplio espectro. Su estructura puede dividirse en dos regiones. La región N terminal catiónica contiene dos residuos de cisteína unidos por un puente disulfuro y un motivo conservado que participa en la unión con el receptor en la célula blanco. La región C terminal está menos conservada, puede ser hidrofóbica o anfifílica y está involucrada en la especificidad y reconocimiento de la célula diana (Alvarez- Sieiro y col., 2016; Woraprayote y col., 2016). Las bacteriocinas de esta clase se subdividen en ocho grupos según sus estructuras primarias. La bacteriocina mejor estudiada de este tipo es la pediocina PA- 1 producida por *Pediococcus acidilactici* (Alvarez- Sieiro y col., 2016; O'Bryan y col., 2018).
- *Clase IIb o bacteriocinas de dos péptidos*: constan de dos componentes. En algunos casos la actividad antimicrobiana requiere la presencia de ambos péptidos, mientras que en otros los péptidos individuales manifiestan por sí mismos actividad antimicrobiana, aunque su combinación aumenta la actividad (Alvarez- Sieiro y col., 2016; Kaškonienė y col., 2017).
- *Clase IIc o bacteriocinas sin líder*: este tipo de bacteriocinas presentan la característica distintiva de ser sintetizadas sin un péptido líder N- terminal, que usualmente funciona como una secuencia de reconocimiento para la secreción, la modificación y mantiene la bacteriocina inactiva dentro de la célula productora (Alvarez- Sieiro y col., 2016).
- *Clase IId o bacteriocinas de un solo péptido de tipo no pediocínico*: es un grupo heterogéneo de bacteriocinas peptídicas lineales simples no relacionadas, con diferentes estructuras, mecanismos de secreción y modos de acción (Alvarez- Sieiro y col., 2016). Algunos ejemplos son la lactococina A, enterocina B y gassericina A (Alvarez- Sieiro y col., 2016; Kaškonienė y col., 2017).

Clase III: bacteriocinas de alto peso molecular (mayores a 10 kDa) no modificadas con mecanismo de acción bacteriolítico o no lítico

Las bacteriocinas de *Clase III* son proteínas antimicrobianas de alto peso molecular, termolábiles, normalmente compuestas por diferentes dominios. Por ejemplo, de acuerdo al análisis de secuencias la enterolisina A consiste en un dominio N terminal con actividad endopeptidasa y un dominio de reconocimiento de célula blanco C terminal (Zacharof y Lovitt, 2012; Alvarez- Sieiro y col., 2016). Esta clase se divide en 2 subclases: las bacteriolisinas y aquellas bacteriocinas que presentan un modo de acción que no involucra la lisis de la célula blanco (Ben Lagha y col., 2017).

Tabla 1: Clasificación de bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas

Clase de bacteriocinas	Ejemplo	Microorganismo productor	Espectro de actividad	Referencia	
Clase I	Ia: lantipéptidos	nisina	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus</i> spp.	Bacterias Gram positivas	Kaškonienė y col., 2017; O'Bryan y col., 2018
		lacticina 3147	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Bacterias Gram positivas	Bakhtiary y col., 2017
	Ib: péptidos cíclicos	enterocina AS- 48	<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacterias Gram positivas, <i>Leishmania donovani</i>	Abengózar y col., 2017
		garvicina ML	<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Listeria</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.,	Gabrielsen y col., 2014 Alvarez- Sieiro y col., 2016
	Ic: sactibióticos	subtilosina A	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacterias Gram positivas y Gram negativas	Mathur y col., 2015
		thuricina CD	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bacterias Gram positivas formadoras de esporas	Mathur y col., 2017
	Id: péptidos lineales que contienen azolina	plantazolicina A	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	Fenner y col., 2016
Ie: glicocinas	enterocina F4- 9	<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacterias Gram positivas y Gram negativas	Maky y col., 2015	
If: péptidos de lazo	Lassomicina	<i>Lentzea kentuckyensis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Lear y col., 2016	
Clase II	IIa: bacteriocinas tipo pediocina	pediocina PA- 1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Bacterias Gram positivas	O'Bryan y col., 2018
		leucocina A	<i>Leuconostoc gelidum</i>	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i>	Balay y col., 2017
	IIb: bacteriocinas de dos péptidos	lactococcina G	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Clostridium</i> spp., <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactobacillus</i> spp.	Woraprayote y col., 2016
		lactocina 705	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Listeria</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.	Karpiński y Szkaradkiewicz 2013
	IIc: bacteriocinas sin líder	enterocina L50	<i>Enterococcus faecium</i> L50	<i>Clostridium</i> spp., <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. sakei</i> , <i>Propionibacterium</i> spp.	Alvarez- Sieiro y col., 2016
II d: Bacteriocinas de un solo péptido de tipo no pediocínico	enterocina B	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>C. tyrobutyricum</i> ,	Dünder y col., 2014	
Clase III	bacteriolisinas	millericina B	<i>Streptococcus milleri</i> NMSCC061	Bacterias Gram positivas	Sharma y col., 2016
		enterolisina A	<i>Enterococcus faecalis</i> B9510	<i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i>	Khan y col., 2013
	Bacteriocinas no líticas	caseicina A y B	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>S. pneumoniae</i> , <i>Sarcina</i> spp., <i>B. subtilis</i> , <i>S. pyogenes</i>	Sánchez y Vázquez, 2017
	helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481	<i>L. helveticus</i> , <i>L. jugurti</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i>	Zhang y col., 2012	

2.2.4.8.2. Mecanismos de acción de las bacteriocinas de bacterias Gram positivas

La actividad antimicrobiana producida por las bacteriocinas puede tener un modo de acción bacteriostático o bactericida. El primero conduce a un retraso en el desarrollo y multiplicación de las células sensibles, mientras que un modo de acción bactericida les permite inhibir el crecimiento bacteriano conduciendo a la muerte celular, que puede ir acompañada de lisis o no.

Se ha demostrado que los principales blancos de acción de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas en los microorganismos sensibles son la membrana citoplasmática, la pared celular y algunas enzimas importantes en su metabolismo. De esta manera, las bacteriocinas ejercen su actividad a través de diferentes mecanismos, entre los que se pueden mencionar (Mokoena, 2017):

1. Formación de poros en la membrana citoplasmática. Este mecanismo ha sido descrito para bacteriocinas de *clase Ia* (nisina, lacticina 3147), *clase Ib* (carnociclina A, enterocina AS-48), *clase IIa* (pediocina PA-1, leucocina A, sakacina A) y *clase IIb* (lactococcina G, termofilina 13) (Alvarez- Sieiro y col., 2016; Woraprayote y col. 2016).
2. Interferencia en los procesos de biosíntesis de pared celular, como es el caso de algunas bacteriocinas de *clase Ia* (nisina y mersacidina) y *clase IIc* (lactococcina 972) (Mantovani y col., 2011; Ahmad y col., 2017).
3. Otros modos de acción descritos son: inhibición del transporte de carbohidratos, inhibición de la síntesis de ADN y proteínas. Estos mecanismos se han descrito, por ejemplo, para bacteriocinas de *clase III* no líticas como la disgalacticina, caseicina y helveticina J (Alvarez- Sieiro y col., 2016; Ahmad y col., 2017).

La mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL presentan actividad antimicrobiana al inducir la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células sensibles. Esto provoca la salida de iones, aminoácidos y otras moléculas esenciales, lo que disipa la fuerza protón motriz y conduce a la muerte celular (Ahmad y col., 2017; Ríos Colombo y col., 2017). Este modo de acción ha sido el más estudiado y mejor descrito. El mecanismo de formación de poros involucra 3 etapas: unión a la membrana, inserción y agregación de monómeros para formar el poro. Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas poseen carga neta positiva, la cual favorece su interacción electrostática con la carga neta negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de bacterias Gram negativas o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular de bacterias Gram positivas (Gharsallaoui y col., 2015; Ríos Colombo y col., 2017). Por lo tanto, son capaces de interactuar con receptores específicos en la superficie celular de los microorganismos sensibles. La mayoría de las bacteriocinas de clase Ia como

la nisina o lacticina 3147 se unen al lípido II presente en la pared celular de las células sensibles. Este compuesto es un intermediario clave en la síntesis de peptidoglicano por lo tanto, además de inducir la formación de poros, esta unión también inhibe la síntesis de pared celular en las células sensibles (Cotter y col., 2013; O' Bryan y col., 2018). La nisina se une al lípido II por su parte N- terminal y el extremo C- terminal se transloca a través de la membrana de las células sensibles. Posteriormente, se ensamblan cuatro de estos complejos nisina- lípido II y se agregan otras cuatro moléculas adicionales de nisina para formar un poro de 2 nm de diámetro (figura 2A) (Oppedijk y col., 2015). Las bacteriocinas de la *clase IIa*, como la pediocina PA- 1 se unen en cambio a proteínas del sistema de transporte manosa- fosfotransferasa (man- PTS) tipo I presentes en la membrana citoplasmática de las células sensibles, por lo tanto este mecanismo también afecta el transporte de manosa y glucosa (Ríos Colombo y col., 2017). El sistema man- PTS consta de cuatro dominios proteicos: IIA, IIB, IIC y IID (Kjos y col., 2011). Las bacteriocinas de la *clase IIa* se unen al dominio IIC por su región N- terminal conservada mediante interacciones electrostáticas, luego el extremo hidrofóbico C- terminal interactúa con las hélices de transmembrana de los dominios IIC y/o IID, lo cual provoca cambios conformacionales que llevan a la formación del poro (figura 2B) (Kjos y col., 2011; Woraprayote y col., 2016; Ríos Colombo y col., 2017).

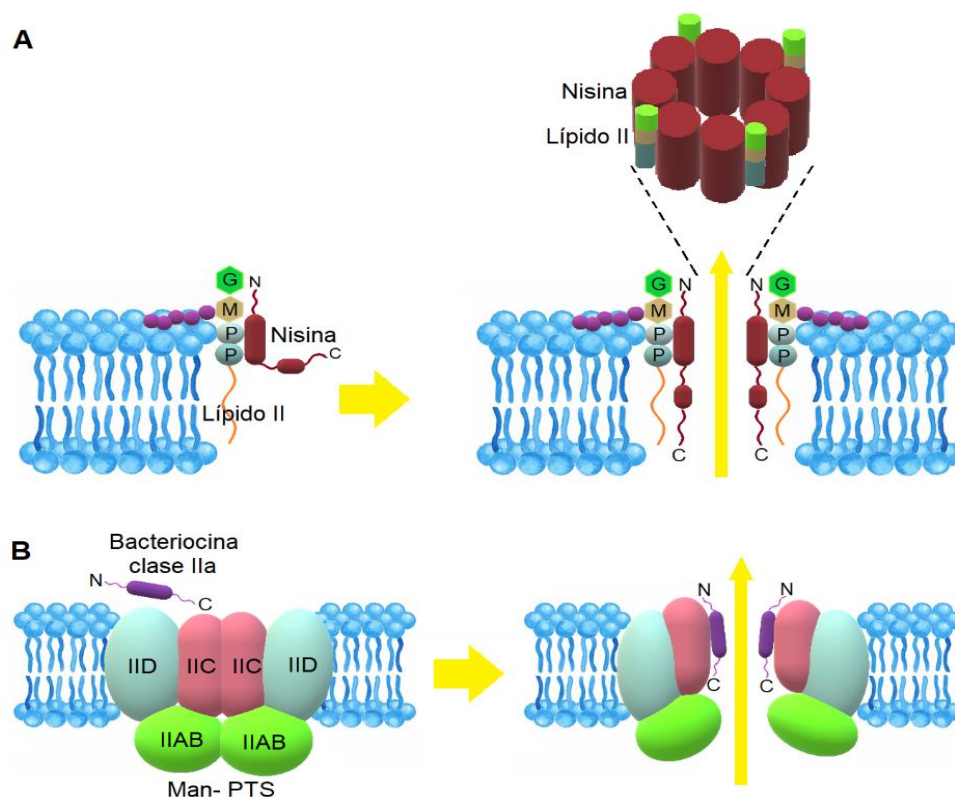


Figura 2: Mecanismo de formación de poros de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (Kjos y col., 2011; Oppedijk y col., 2015).

Referencias: 2A: Bacteriocinas de clase Ia; 2B: Bacteriocinas de clase IIa.

2.2.4.9. Caracterización de sustancias con actividad antimicrobiana

La producción de sustancias con actividad antimicrobiana, especialmente bacteriocinas, representa un rasgo muy importante de las bacterias ácido lácticas y les otorga un elevado potencial, ya sea como microorganismos probióticos o biopreservadores (Borrero y col., 2018). Como se mencionó con anterioridad, estas sustancias antagónicas difieren ampliamente en cuanto a sus características estructurales, propiedades bioquímicas, mecanismos de acción, entre otros. Por lo tanto, caracterizarlas resulta esencial para la descripción de nuevas bacteriocinas y su posterior aplicación.

Comúnmente, la caracterización preliminar de estos metabolitos consiste en extraer los sobrenadantes libres de células a partir un cultivo de la cepa productora y someterlos a diferentes tratamientos, evaluando posteriormente su actividad inhibitoria. Estos tratamientos pueden variar según la bibliografía, sin embargo, el estudio de la sensibilidad de los metabolitos a enzimas proteolíticas es fundamental para corroborar su naturaleza proteica, característica de bacteriocinas o sustancias similares a bacteriocinas. Luego, algunos autores suelen estudiar el efecto de otras enzimas (lisozima, catalasa, lipasa, α -amilasa) (Ahn y col., 2017; Lv y col., 2017), la estabilidad a elevadas temperaturas y diferentes valores de pH (Avaiyarasi y col., 2016; Peng y col., 2017), la sensibilidad al tratamiento con urea, diferentes agentes surfactantes (SDS, EDTA, Tween 80) y solventes orgánicos (etanol, metanol, isopropanol, acetona) (Kaur y Tiwari, 2015; Ge y col., 2016), entre otros.

3. Hipótesis

3. HIPÓTESIS

Las cepas de *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. producen diferentes sustancias con actividad antimicrobiana.

4. Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Caracterizar las sustancias con actividad antimicrobiana producidas por cepas de *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. aisladas de residuos de cervecería.

4.2. Objetivos específicos

- Reaislar cepas de *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. y *Leuconostoc* spp.
- Confirmar la identidad de los microorganismos a estudiar mediante pruebas bioquímicas.
- Estudiar la actividad antimicrobiana de las cepas de BAL previamente aisladas de residuos de cervecería sobre *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.
- Caracterizar las sustancias con actividad antimicrobiana producidas por las cepas de BAL.
- Evaluar los resultados y analizar los mismos estadísticamente.

5. Materiales y métodos

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas de bacterias ácido lácticas utilizadas y condiciones de cultivo

Se trabajó con 5 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecientes al cepario del área de Bacteriología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico- Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC). Estas cepas bacterianas fueron previamente aisladas a partir de residuos de cervecería procedentes de una fábrica situada en Villa General Belgrano (Córdoba, Argentina), según la metodología propuesta por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 1996). Las BAL aisladas fueron identificadas a nivel de género y especie como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B87, *Pediococcus acidilactici* B82, *Pediococcus acidilactici* B83, *Pediococcus pentosaceus* B86 y *Leuconostoc mesenteroides* B19 (Gerbaldo, 2013; Asurmendi y col., 2016).

Cada una de las cepas de BAL fueron sembradas en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) e incubadas a 37 °C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (CO₂ al 5%). A partir de estos cultivos, las cepas de BAL fueron aisladas en placas con agar MRS manteniéndose las condiciones de incubación anteriormente descriptas.

Con el objetivo de confirmar la identidad de las cepas de BAL se realizó a cada una de ellas una coloración de Gram y las siguientes pruebas bioquímicas de género propuestas por el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Vos y col., 2009):

- Producción de catalasa
- Citocromo oxidasa
- Producción de CO₂ a partir de glucosa
- Crecimiento a diferentes temperaturas: 10 y 45 °C
- Crecimiento a diferentes valores de pH: 4,4 y 9,6
- Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl: 6,5 y 18% (p/v)

La confirmación de la identidad de las BAL a nivel de especie se realizó según la producción de ácido a partir de las siguientes fuentes de carbono: glicerol, eritritol, D- arabinosa, L- arabinosa, D- xilosa, D- adonitol, D- galactosa, D- glucosa, D- fructosa, D- manosa, L- ramnosa, Dulcitol, Inositol, D- manitol, D- celobiosa, D- maltosa, D- lactosa, D- melobiosa, D- sacarosa, D- trehalosa, D- rafinosa y almidón (Vos y col., 2009; Asurmendi y col., 2016).

Cada cepa de BAL se conservó a - 20 °C en caldo MRS suplementado con glicerol al 30% (v/v).

5.2. Cepas de bacterias indicadoras utilizadas y condiciones de cultivo

Para la determinación de la actividad antimicrobiana y caracterización de los metabolitos secundarios producidos por las cepas de BAL en estudio se emplearon un total de 17 cepas de distintos microorganismos patógenos como indicadores. Se incluyeron seis cepas de *Staphylococcus aureus*, dos cepas de *Listeria monocytogenes*, cinco cepas de *Escherichia coli*, dos cepas de *Salmonella* spp. y dos cepas de *Shigella* spp. pertenecientes al cepario del área de Bacteriología de la UNRC.

Los microorganismos indicadores fueron sembrados en caldo tripticasa soya (CTS) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se aislaron en placas con agar tripticasa soya (ATS) y se incubaron manteniendo las condiciones anteriormente descritas. Para confirmar la pureza e identidad de cada cepa, a partir de las colonias aisladas se realizó una coloración de Gram y las siguientes pruebas bioquímicas propuestas por el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Vos y col., 2009) (tabla 2):

Tabla 2: Pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos indicadores

Microorganismo indicador	Prueba bioquímica
<i>S. aureus</i>	Catalasa Coagulasa Susceptibilidad a Bacitracina Fermentación de la glucosa Fermentación del manitol
<i>L. monocytogenes</i>	Catalasa Citocromo C oxidasa Hidrólisis de la esculina Hidrólisis del hipurato Movilidad a 25 °C Producción de β- hemólisis en agar sangre de carnero (5%) Prueba de CAMP con <i>S. aureus</i> Utilización aeróbica de D- glucosa L- ramnosa, D- xilosa, manitol y ribosa.
<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp.	Fermentación de la glucosa Citocromo C oxidasa Citrato de Simmons Reacción del Indol Reacción de Voges- Proskawer Reacción del Rojo de Metilo Prueba de T.S.I. Fenilalanina Ureasa Movilidad

5.3. Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. sobre diferentes microorganismos patógenos

5.3.1. Técnica de estrías cruzadas

El espectro de inhibición de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de BAL se determinó mediante la técnica de estrías cruzadas descrita por Asurmendi y col. (2016), utilizando diferentes cepas de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. como microorganismos indicadores. Se sembró una colonia aislada de cada cepa de BAL en un tubo conteniendo 2 ml de caldo MRS y se incubó a 37 °C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (CO₂ al 5%). A partir de cada cultivo obtenido, se sembró una estría central en una placa conteniendo agar MRS con agar al 1,2% (p/v) para facilitar la difusión de los compuestos antimicrobianos y se incubó bajo las condiciones anteriormente descritas. Luego, el crecimiento bacteriano fue inactivado mediante la exposición a vapores de cloroformo durante 20 min y aireado 10 min. Posteriormente, a partir de un cultivo de cada una de las cepas indicadoras en CTS se realizaron estrías perpendiculares al crecimiento central de cada BAL y se incubó a 37 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se midieron los halos de inhibición del crecimiento de los diferentes microorganismos ensayados (en mm).

De las 5 cepas de BAL en estudio, se seleccionaron arbitrariamente *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82 y *L. mesenteroides* B19 para determinar la actividad inhibitoria de sus sobrenadantes y caracterizar los metabolitos antimicrobianos presentes en los mismos.

5.4. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes sin tratar y neutralizados de bacterias ácido lácticas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante la técnica de difusión en pozos

Para la obtención de los sobrenadantes libres de células (SLC) las cepas *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82 y *L. mesenteroides* B19 fueron sembradas en tubos conteniendo 2 ml de caldo MRS e incubadas a 37 °C durante 24 h en microaerofilia. Un inóculo de 2 ml de cada cultivo fue adicionado a tubos conteniendo 8 ml de MRS y se incubaron a 37 °C durante 20 h en microaerobiosis. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 8500 rpm a 4 °C durante 20 min. Se recolectaron los SLC en viales estériles, los cuales fueron expuestos a vapores de cloroformo durante 20 min y aireados durante 10 min para asegurar la esterilidad de los mismos. Para suprimir la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos producidos por las cepas de BAL, los SLC fueron neutralizados utilizando una solución de hidróxido de sodio 1 N, obteniéndose de esta manera los sobrenadantes libres de células neutralizados (SLCN) (Pascual y col., 2008a).

La actividad antimicrobiana de los SLC y SLCN de las BAL en estudio se determinó sobre 2 cepas de *S. aureus* (156 y 169) y 3 cepas de *E. coli* (201, LAMA 543 y LAMA 544). Para ello, se realizó la técnica de difusión en pozos descrita por Asurmendi y col. (2015). A partir de una suspensión de cada cepa indicadora con una densidad óptica equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) se hisopó en varias direcciones una placa conteniendo ATS con una concentración de agar de 1,2% (p/v). Luego, se efectuaron pozos de 8 mm de diámetro en el agar con un sacabocado estéril, los cuales fueron adicionados con 100 μ l de los SLC y SLCN de cada cepa de BAL. Luego de 24 h de incubación a 37 °C, se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de las diferentes cepas indicadoras (en mm).

5.5. Caracterización de las sustancias antimicrobianas producidas por *Lactococcus lactis* B87, *Pediococcus acidilactici* B82 y *Leuconostoc mesenteroides* B19 sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica serotipo O157:H7

Para caracterizar las sustancias con actividad antimicrobiana producidas por *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82 y *L. mesenteroides* B19, los SLC de cada BAL fueron sometidos a diferentes tratamientos. La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes tratados y sin tratar se evaluó mediante la técnica de difusión en pozos descrita en el punto 5.4. Para este estudio se utilizó como microorganismo indicador una cepa de *E. coli* enterohemorrágica serotipo O157:H7 (LAMA 543).

5.5.1. Evaluación de la sensibilidad a enzimas proteolíticas de los metabolitos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas

El estudio de sensibilidad a enzimas proteolíticas se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Pilasombut y col. (2015). Se obtuvieron los SLC de cada cepa de BAL mediante la técnica descrita anteriormente. Cada SLC fue ajustado a pH 7 utilizando una solución de hidróxido de sodio 1 N. A los SLCN sin diluir, diluidos al medio y al cuarto en caldo MRS, se les agregó tripsina a una concentración final de 1 mg/ml y se los incubó a 37 °C durante 2 h. Posteriormente, se determinó la actividad antimicrobiana de los SLCN tratados y sin tratar (control) mediante la técnica de difusión en pozos descrita previamente.

5.5.2. Evaluación de la sensibilidad a elevadas temperaturas de los metabolitos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas

Se investigó el efecto del tratamiento térmico sobre la actividad de las sustancias antimicrobianas presentes en los sobrenadantes obtenidos de *L. lactis* B87, *P. acidilactici*

B82 y *L. mesenteroides* B19 de acuerdo a la técnica descrita por Peng y col. (2017). Se obtuvieron los SLC de las cepas de BAL mediante la técnica descrita en el punto 5.4. Cada SLC fue fraccionado en tres viales estériles. Uno de ellos no recibió tratamiento térmico (control), el segundo fue sometido a 100 °C durante 1 h y el tercero a 121 °C durante 10 min. La actividad antimicrobiana de los SLC fue determinada utilizando la técnica de difusión en pozos. Los halos de inhibición del crecimiento producidos por los SLC sometidos a elevadas temperaturas fueron comparados con los producidos por los SLC sin tratar (control).

5.5.3. Evaluación de la estabilidad a diferentes valores de pH de los metabolitos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas

Los SLC de las cepas de BAL fueron obtenidos como se describió previamente. Los mismos fueron ajustados a diferentes valores de pH (2, 4, 5, 7, 9 y 11) con ácido clorhídrico 1 N e hidróxido de sodio 1 N. Los SLC tratados fueron incubados a 4 °C durante 5 y 15 h. Finalizado el período de incubación, se ajustó el pH de todos los SLC tratados a un valor de 5,5. Se utilizaron como controles los SLC sin tratar (Arakawa y col., 2015). Finalmente, se evaluó la actividad antimicrobiana de los SLC tratados y control sin tratar mediante la técnica de difusión en pozos ya descrita, obteniéndose los halos de inhibición del crecimiento bacteriano (mm).

5.5.4. Evaluación de sensibilidad al tratamiento con urea de los metabolitos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas

Para estudiar la sensibilidad a urea de las sustancias antimicrobianas presentes en los sobrenadantes obtenidos de *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82 y *L. mesenteroides* B19, se extrajeron los sobrenadantes correspondientes a cada cepa a partir de un cultivo de 24 h en caldo MRS y se neutralizaron posteriormente de acuerdo a la metodología ya descrita. Los SLCN obtenidos fueron tratados con una solución de urea 4 M a una concentración final de 1% (p/v) e incubados a 37 °C durante 5 h. Por último, se determinó la actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en pozos. Los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por los SLCN tratados con urea fueron comparados con los producidos por los SLCN sin tratar (Kaur y Tiwari, 2015).

5.6. Modo de acción de los metabolitos antimicrobianos producidos por *Lactococcus lactis* B87, *Pediococcus acidilactici* B82 y *Leuconostoc mesenteroides* B19 sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica serotipo O157:H7

A partir de un cultivo de *E. coli* LAMA 543 de 24 h de incubación en CTS se obtuvo una suspensión bacteriana con una turbidez equivalente al tubo 1 de la escala de McFarland (3×10^8 UFC/ml) y se realizaron tres diluciones decimales seriadas. A partir de la última dilución, se tomaron alícuotas de 2,8 ml y se sembraron en 4 Erlenmeyers conteniendo 25,7 ml de CTS. De esta manera, la concentración final de la cepa indicadora en cada Erlenmeyer estuvo en el orden de 10^4 UFC/ml. Los Erlenmeyers fueron incubados a 37 °C y a intervalos de 1 h se extrajeron muestras para evaluar el crecimiento bacteriano mediante mediciones de densidad óptica (DO) a 600 nm. Una vez que la cepa indicadora entró en fase de crecimiento exponencial, tres de los Erlenmeyers fueron adicionados con 7,5 ml del SLCN de *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82 o *L. mesenteroides* B19. El último Erlenmeyer fue el cultivo control, al cual se adicionó CTS en lugar de SLCN. Los Erlenmeyers fueron incubados a 37 °C por 48 h. Durante las primeras 24 h de incubación, se evaluó el crecimiento bacteriano mediante mediciones de $DO_{600 \text{ nm}}$ a intervalos de 1 h y se realizó el recuento de células viables cada 2 h. Luego se continuó midió el crecimiento microbiano ($DO_{600 \text{ nm}}$ y recuento de células viables) a las 48 h de incubación. Para realizar el recuento de células viables se obtuvieron diluciones decimales seriadas de cada cultivo en agua peptonada a los diferentes tiempos del ensayo. Se adicionaron 0,1 ml de estas diluciones en placas con ATS por duplicado, el inóculo se diseminó con espátula de Drigalsky y luego se incubaron las placas a 37 °C durante 24 h. Se seleccionaron las placas que presentaron entre 30 y 300 colonias y se realizó el recuento de las mismas. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml) conforme a la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ ml} = \bar{X} \times \text{Factor de dilución} \times \text{Factor de alícuota}$$

En donde \bar{X} corresponde al promedio de colonias de *E. coli* LAMA 543 entre los duplicados de las placas.

Los valores de recuento fueron luego transformados a \log_{10} UFC/ml y se construyeron las curvas de crecimiento (\log_{10} UFC/ml vs tiempo) de *E. coli* LAMA 543 en cada tratamiento.

5.7. Análisis estadísticos

Todos los resultados obtenidos durante esta investigación fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) utilizando para ello el software estadístico INFOSTAT (Di Rienzo y col., 2011). Las medias fueron comparadas mediante el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.8. Medios de cultivo

Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de bacterias ácido lácticas

Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Britania)	
Fórmula en gramos por litro	
Proteosa peptona Nº 3	10.00
Extracto de carne	8.00
Extracto de levadura	4.00
Glucosa	20.00
Monoleato de sorbitán	1 ml
Fosfato dipotásico	2.00
Acetato de sodio	5.00
Citrato de amonio	2.00
Sulfato de magnesio	0.20
Sulfato de manganeso	0.05
pH final: 6.4 ± 0.2	

Agar Man Rogosa Sharpe (MRS) (Britania)	
Fórmula en gramos por litro	
Proteosa peptona Nº 3	10.00
Extracto de carne	8.00
Extracto de levadura	4.00
Glucosa	20.00
Monoleato de sorbitán	1 ml
Fosfato dipotásico	2.00
Acetato de sodio	5.00
Citrato de amonio	2.00
Sulfato de magnesio	0.20
Sulfato de manganeso	0.05
Agar	12.00
pH final: 6.4 ± 0.2	

Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.

Caldo Trypticase Soya (CTS) (Britania)	
Fórmula en gramos por litro	
Tripteína	17.00
Peptona de soya	3.00
Cloruro de sodio	5.00
Fosfato dipotásico	2.50
Glucosa	2.50
pH final: 7.3 ± 0.2	

Agar Trypticase Soya (ATS) (Britania)	
Fórmula en gramos por litro	
Tripteína	15.00
Peptona de soya	5.00
Cloruro de sodio	5.00
Agar	15.00
pH final: 7.3 ± 0.2	

6. Resultados y discusión

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Reislamiento y confirmación de la identidad de las bacterias ácido lácticas

Las colonias de *L. lactis*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* y *L. mesenteroides* aisladas en agar MRS se observaron pequeñas, lisas, circulares, de color blanquecino y con bordes bien definidos. La coloración de Gram mostró, en el caso de *L. lactis*, cocos Gram positivos esféricos dispuestos individualmente, de a pares o en cadenas (figura 3A). Las especies del género *Pediococcus* se observaron como cocos Gram positivos esféricos dispuestos de manera individual, de a pares o en tétradas (figura 3B). Por último, la observación microscópica de *L. mesenteroides* reveló cocos Gram positivos ligeramente ovalados dispuestos individualmente, de a pares o en cadenas (figura 3C).

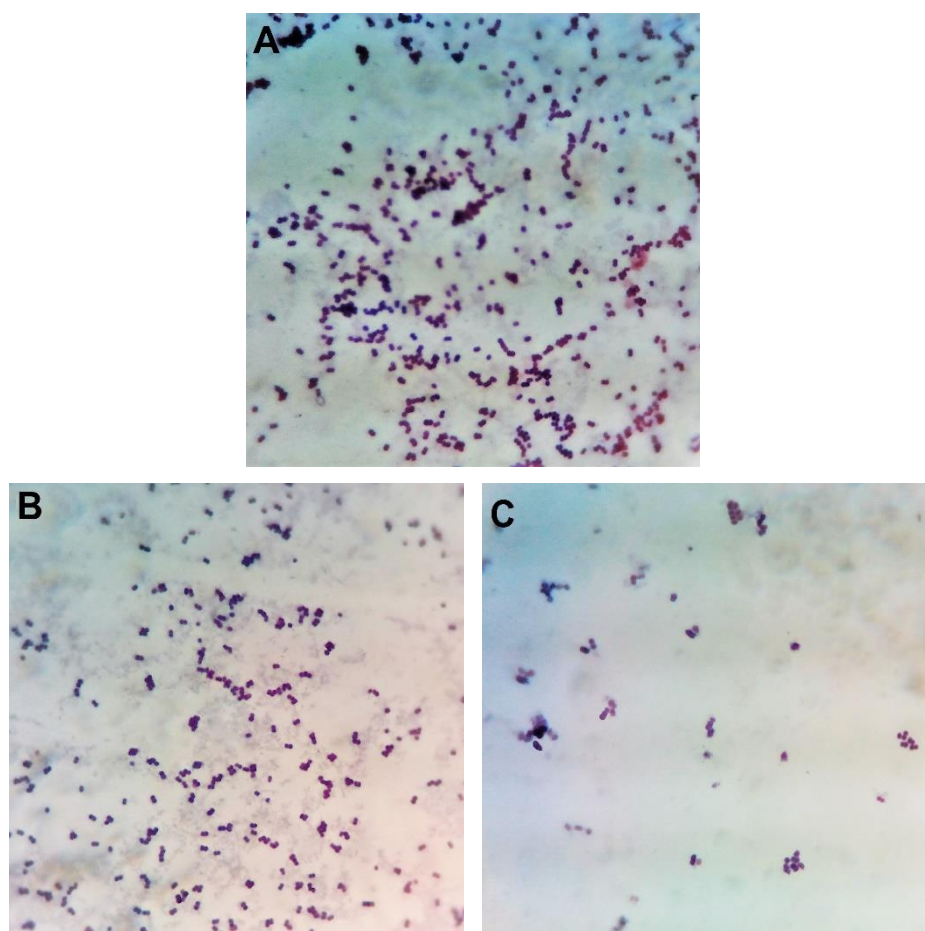


Figura 3: Coloración de Gram de *Lactococcus lactis* B87 (A), *Pediococcus acidilactici* B82 (B) y *Leuconostoc mesenteroides* B19 (C) (1000x).

En la tabla 3 se muestran las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de las BAL a nivel de género. De acuerdo a estos resultados se confirmó que las cepas en estudio correspondían a los géneros *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. y *Leuconostoc* spp.

Tabla 3: Pruebas bioquímicas para la identificación de *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. y *Leuconostoc* spp.

Pruebas bioquímicas	B87	B82	B83	B86	B19
Catalasa	-	-	-	-	-
Citocromo oxidasa	-	-	-	-	-
Producción de CO ₂ a partir de glucosa	-	-	-	-	+
Crecimiento a 10 °C	+	-	-	+	+
Crecimiento a 45 °C	-	+	+	+	-
Crecimiento a pH 4,4	-	+	+	+	-
Crecimiento a pH 9,6	-	-	-	-	-
Crecimiento en NaCl 6,5% (p/v)	-	+	+	+	+
Crecimiento en NaCl 18% (p/v)	-	-	-	-	-

Referencias: B87: *L. lactis* B87; B82: *P. acidilactici* B82; B83: *P. acidilactici* B83; B86: *P. pentosaceus* B86; B19: *L. mesenteroides* B19; (+) positivo; (-) negativo.

En la tabla 4 se presentan los patrones de fermentación de distintas fuentes de carbono para la identificación de las BAL a nivel de especie. Estos resultados permitieron verificar la identidad de las cepas como *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82, *P. acidilactici* B83, *P. pentosaceus* B86 y *L. mesenteroides* B19 (Asurmendi y col., 2016).

Tabla 4: Patrones de fermentación de hidratos de carbono para bacterias ácido lácticas

Hidratos de carbono	B87	B82	B83	B86	B19
Glicerol	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-
D- arabinosa	d	d	d	+	-
L- arabinosa	+	+	+	+	+
D- xilosa	+	d	-	-	+
D- adonitol	d	d	-	+	-
D- galactosa	+	+	+	+	+
D- glucosa	+	+	+	+	+
D- fructosa	+	+	+	+	+
D- manosa	+	+	+	+	+
L- ramnosa	d	d	d	-	-
Dulcitol	d	-	-	-	-
Inositol	+	-	-	-	-
D- manitol	-	-	d	-	-
D- celobiosa	+	+	+	+	+
D- maltosa	+	+	+	+	+
D- lactosa	+	-	-	+	-
D- melobiosa	-	-	-	-	+
D- sacarosa	d	+	+	-	+
D- trehalosa	+	+	+	+	+
D- rafinosa	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-

Referencias: B87: *L. lactis* B87; B82: *P. acidilactici* B82; B83: *P. acidilactici* B83; B86: *P. pentosaceus* B86; B19: *L. mesenteroides* B19; (+) positivo; (-) negativo; (d) dudoso.

6.2. Reaislamiento y confirmación de la identidad de los microorganismos indicadores

6.2.1. *Staphylococcus aureus*

La observación microscópica de las colonias aisladas en ATS mostró cocos Gram positivos dispuestos de a pares, en tétradas o en racimos (figura 4). Se realizaron las pruebas bioquímicas de catalasa y coagulasa obteniendo resultado positivo para ambas. Las cepas fueron resistentes a bacitracina y fermentaron la glucosa y el manitol. Estos resultados permitieron verificar su identidad como *S. aureus*.

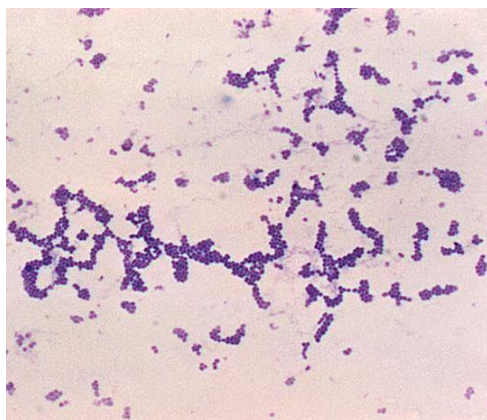


Figura 4: Coloración de Gram de un cultivo de *Staphylococcus aureus* (1000x).

6.2.2. *Listeria monocytogenes*

La tinción de Gram de las colonias aisladas en ATS reveló bacilos Gram positivos cortos, no esporulados, no ramificados, dispuestos de manera individual o en cortas cadenas. Las pruebas metabólicas realizadas confirmaron que las cepas correspondían a *L. monocytogenes* (tabla 5).

Tabla 5: Pruebas bioquímicas para la identificación de *Listeria monocytogenes*

Pruebas bioquímicas	<i>L. monocytogenes</i>
Catalasa	+
Citocromo C oxidasa	-
Hidrólisis de la esculina	+
Hidrólisis del hipurato	+
Movilidad a 25 °C	+
Producción de β - hemólisis en agar sangre de carnero (5%)	+
Prueba de CAMP (<i>S. aureus</i>)	+
Utilización aeróbica de D- glucosa	+
Utilización aeróbica de L- ramnosa	+
Utilización aeróbica de D- xilosa	-
Utilización aeróbica de manitol	-
Utilización aeróbica de ribosa	-

Referencias: (+) positivo; (-) negativo.

6.2.3. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.

En la tinción de Gram de las colonias aisladas en ATS se observaron bacilos Gram negativos rectos y cortos. Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para su identificación se presentan en la tabla 6. Estos permitieron corroborar la identidad de las diferentes cepas de enterobacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.

Tabla 6: Pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias

Pruebas bioquímicas	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Shigella</i> spp.
Fermentación de la glucosa	+	+	+
Citocromo C oxidasa	-	-	-
Citrato de Simmons	-	+/-	-
Reacción del Indol	+	-	+/-
Reacción de Voges- Proskawer	-	-	-
Reacción del Rojo de Metilo	+	+	+
Fenilalanina	-	-	-
Ureasa	-	-	-
Movilidad	+	+	-
Prueba de T.S.I.	ácido/ácido, SH ₂ -, gas +	alcalino/ácido, SH ₂ +, gas +	alcalino/ácido, SH ₂ -, gas +/-

Referencias: (+) positivo; (-) negativo.

6.3. Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. sobre diferentes microorganismos patógenos

6.3.1. Técnica de estrías cruzadas

Se estudió la actividad antimicrobiana producida por las cepas *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82, *P. acidilactici* B83, *P. pentosaceus* B86 y *L. mesenteroides* B19 sobre seis cepas de *S. aureus*, dos cepas de *L. monocytogenes*, cinco cepas de *E. coli*, dos cepas de *Salmonella* spp. y dos cepas de *Shigella* spp.

En la tabla 7 se muestran los diámetros de los halos de inhibición promedio producidos por las BAL sobre cada una de las cepas de *S. aureus*. Se observó que todas las cepas de BAL ensayadas produjeron inhibición del crecimiento de *S. aureus*. Los halos de inhibición producidos por B87, B82, B83, B86 y B19 fueron en promedio de $23,25 \pm 3,72$ mm; $19,67 \pm 2,01$ mm; $19,58 \pm 2,64$ mm; $21,58 \pm 3,20$ mm y $16,42 \pm 1,41$ mm, respectivamente. Las cepas B87 y B86 presentaron mayor actividad antimicrobiana en comparación con el resto de las cepas de BAL estudiadas, mostrando halos máximos de inhibición de 26,00 y 24,50 mm, respectivamente. Estos resultados difieren parcialmente de los publicados por Jabbari y col. (2017), quienes informaron trabajando con otra BAL como es *Lactobacillus acidophilus*, halos de inhibición del crecimiento de *S. aureus* con

diámetros entre 10,80 y 12,10 mm. Por otra parte, Mahmoudi y col. (2016) evaluaron la actividad antimicrobiana producida por diferentes cepas de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus plantarum* sobre *S. aureus* observando halos máximos de inhibición de 12,00 mm de diámetro. Resulta relevante que en este trabajo la actividad antimicrobiana producida por las cepas de BAL es significativamente superior a la hallada por estos autores, ya que los halos de inhibición fueron de diámetros mayores, oscilando entre 15,50 y 26,00 mm.

Tabla 7: Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas sobre distintas cepas de *Staphylococcus aureus* mediante la técnica de estrías cruzadas.

Cepas de <i>S. aureus</i>	Valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento (mm) ± DS				
	B87	B82	B83	B86	B19
145	25,00 ± 2,83 ^a	18,00 ± 1,41 ^a	21,50 ± 0,71 ^a	22,50 ± 2,12 ^a	17,50 ± 0,71 ^a
146	17,50 ± 2,12 ^a	18,50 ± 0,71 ^a	16,50 ± 0,71 ^a	16,50 ± 0,71 ^a	16,50 ± 2,12 ^a
147	24,50 ± 3,53 ^a	19,50 ± 0,71 ^a	19,50 ± 3,53 ^a	24,00 ± 2,83 ^a	15,50 ± 1,41 ^a
156	26,00 ± 2,83 ^a	23,00 ± 1,41 ^a	22,50 ± 2,12 ^a	24,50 ± 1,41 ^a	16,50 ± 0,71 ^a
168	22,50 ± 4,95 ^a	18,50 ± 2,12 ^a	19,00 ± 2,83 ^a	21,50 ± 3,53 ^a	16,50 ± 1,41 ^a
169	24,00 ± 1,41 ^a	20,50 ± 0,71 ^a	18,50 ± 2,12 ^a	20,50 ± 0,71 ^a	16,00 ± 2,83 ^a
Promedio	23,25 ± 3,72^B	19,67 ± 2,01^{AB}	19,58 ± 2,64^{AB}	21,58 ± 3,20^B	16,42 ± 1,41^A

*Letras minúsculas iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición producidos por las BAL sobre las distintas cepas de *S. aureus* de acuerdo al test de Tukey ($p > 0,05$). Letras mayúsculas iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre la inhibición producida por cada una de las BAL de acuerdo al test de Tukey ($p > 0,05$).

Referencias: B87: *L. lactis* B87; B82: *P. acidilactici* B82; B83: *P. acidilactici* B83; B86: *P. pentosaceus* B86; B19: *L. mesenteroides* B19.

En las experiencias con *L. monocytogenes*, los resultados mostraron que todas las cepas de BAL en estudio presentaron un efecto antimicrobiano similar sobre este microorganismo patógeno (tabla 8). Los halos de inhibición del crecimiento estuvieron comprendidos entre 19,00 y 22,50 mm, observándose promedios de $21,50 \pm 2,64$ mm;

19,50 ± 1,29 mm; 21,00 ± 1,41 mm; 21,50 ± 1,73 mm y 20,00 ± 1,41 mm con las BAL B87, B82, B83, B86 y B19, respectivamente. Los análisis de varianza ANOVA no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre la actividad antilisteria producida por las diferentes cepas de BAL estudiadas. A diferencia de estos resultados, Cizeikiene y col. (2013) no observaron inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* por *Lactobacillus sakei* KTU05- 6 y *Pediococcus pentosaceus* KTU05- 8, KTU05- 9 y KTU05- 10. Por otra parte, Vyas y col. (2017) reportaron que una cepa de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* presentó actividad antimicrobiana sobre *L. monocytogenes* ATCC 13932. Sin embargo, estos autores observaron halos de inhibición de 12,00 mm de diámetro, considerablemente inferiores a los reportados en este trabajo con las BAL B87, B82, B83, B86 y B19.

Tabla 8: Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas sobre dos cepas de *Listeria monocytogenes* mediante la técnica de estrías cruzadas

Cepas de <i>L.monocytogenes</i>	Valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento (mm) ± DS				
	B87	B82	B83	B86	B19
LM17	22,00 ± 1,41 ^a	20,00 ± 1,41 ^a	20,50 ± 2,12 ^a	22,50 ± 0,71 ^a	20,50 ± 0,71 ^a
LM22	21,00 ± 4,24 ^a	19,00 ± 1,41 ^a	21,50 ± 0,71 ^a	20,50 ± 2,12 ^a	19,50 ± 2,12 ^a
Promedio	21,50 ± 2,64^A	19,50 ± 1,29^A	21,00 ± 1,41^A	21,50 ± 1,73^A	20,00 ± 1,41^A

*Letras minúsculas iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición producidos por las BAL sobre las distintas cepas de *L. monocytogenes* de acuerdo al test de Tukey ($p > 0,05$). Letras mayúsculas iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre la inhibición producida por cada una de las BAL de acuerdo al test de Tukey ($p > 0,05$).

Referencias: B87: *L. lactis* B87; B82: *P. acidilactici* B82; B83: *P. acidilactici* B83; B86: *P. pentosaceus* B86; B19: *L. mesenteroides* B19.

Los diámetros de los halos de inhibición promedio producidos por B87, B82, B83, B86 y B19 sobre *E. coli* se visualizan en la tabla 9. Todas las cepas de BAL ensayadas fueron capaces de inhibir el crecimiento de este microorganismo indicador. La cepa *L. lactis* B87 produjo halos de inhibición comprendidos entre 19,50 y 23,00 mm, con un promedio de 21,60 ± 1,49 mm. Los halos producidos por los pediococos oscilaron entre 17,50 y 24,75 mm, mostrando promedios de 22,45 ± 2,88 mm; 19,50 ± 1,51 mm y 19,50 ± 2,32 mm con las cepas *P. acidilactici* B82, *P. acidilactici* B83 y *P. pentosaceus* B86, respectivamente. Por último, *L. mesenteroides* B19 produjo halos de inhibición que variaron entre 18,50 y

19,50 mm, con un promedio de $18,80 \pm 1,11$ mm. Según los resultados obtenidos, la cepa B82 fue la que presentó mayor actividad antimicrobiana sobre *E. coli*, mostrando halos con diámetros superiores a los producidos por las demás BAL. Los resultados publicados por Yadav y col. (2016) difieren parcialmente de los hallados en este trabajo, ya que en los ensayos que realizaron con diferentes cepas de lactobacilos observaron halos de inhibición muy pequeños (inferiores a 1 mm) o ausencia de actividad inhibitoria sobre *E. coli*, aunque estos autores utilizaron otra metodología. Shokryazdan y col. (2014) también evaluaron la actividad antimicrobiana de diferentes cepas de lactobacilos sobre *E. coli*, observando halos máximos de 14,80 mm. Es de destacar que en este trabajo las cepas B87, B82, B83, B86 y B19 mostraron actividad inhibitoria sobre todas las cepas de *E. coli* ensayadas, produciendo halos de inhibición con diámetros superiores a los observados por otros autores, que estuvieron comprendidos entre 17,50 y 24,75 mm.

Tabla 9: Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas sobre diferentes cepas de *Escherichia coli* mediante la técnica de estrías cruzadas

Cepas de <i>E. coli</i>	Valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento (mm) \pm DS				
	B87	B82	B83	B86	B19
200	21,50 \pm 0,71 ^a	19,50 \pm 0,71 ^a	18,00 \pm 1,41 ^a	18,50 \pm 2,12 ^a	19,00 \pm 1,41 ^a
201	21,50 \pm 1,41 ^a	23,50 \pm 2,12 ^a	18,50 \pm 0,71 ^a	18,50 \pm 0,71 ^a	18,50 \pm 2,12 ^a
202	23,00 \pm 1,41 ^a	22,00 \pm 1,41 ^a	19,50 \pm 0,71 ^a	17,50 \pm 2,12 ^a	18,50 \pm 0,71 ^a
LAMA 543	22,50 \pm 0,71 ^a	22,50 \pm 0,71 ^a	20,00 \pm 1,41 ^a	22,00 \pm 2,83 ^a	19,50 \pm 0,71 ^a
LAMA 544	19,50 \pm 0,71 ^a	24,75 \pm 1,06 ^a	21,50 \pm 1,41 ^a	21,00 \pm 1,41 ^a	18,50 \pm 1,41 ^a
Promedio	21,60 \pm 1,49^{AB}	22,45 \pm 2,88^B	19,50 \pm 1,51^A	19,50 \pm 2,32^A	18,80 \pm 1,11^A

*Letras minúsculas iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición producidos por las BAL sobre las distintas cepas de *E. coli* de acuerdo al test de Tukey ($p > 0,05$). Letras mayúsculas iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre la inhibición producida por cada una de las BAL de acuerdo al test de Tukey ($p > 0,05$).

Referencias: B87: *L. lactis* B87; B82: *P. acidilactici* B82; B83: *P. acidilactici* B83; B86: *P. pentosaceus* B86; B19: *L. mesenteroides* B19.

En la figura 5 se muestran los halos de inhibición del crecimiento de diferentes cepas de *E. coli* producidos por *L. lactis* B87 (5A) y *L. mesenteroides* B19 (5B).

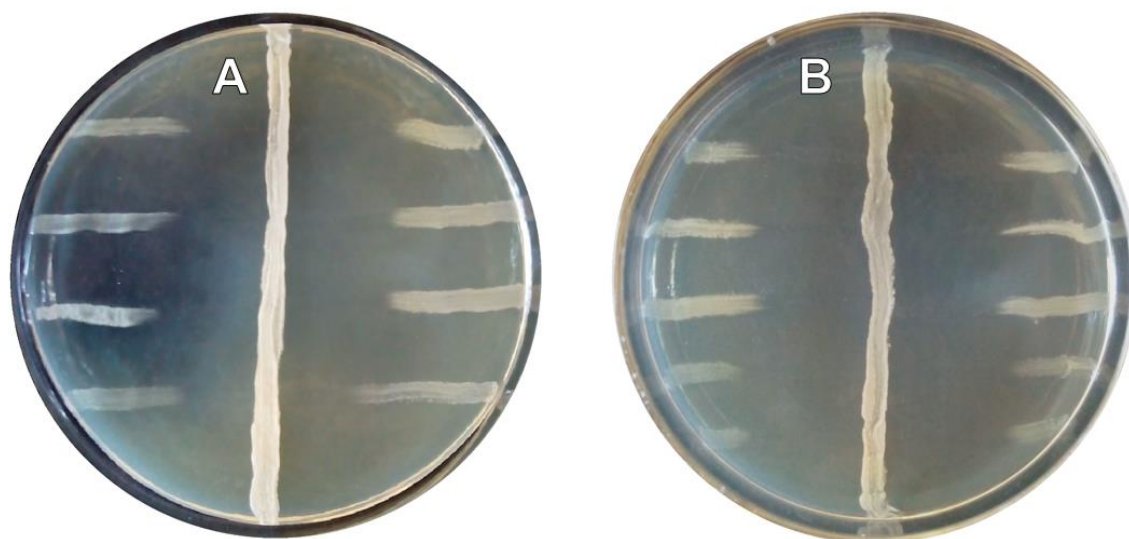


Figura 5: Halos de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* producidos por diferentes bacterias ácido lácticas.

Referencias: A: *Lactococcus lactis* B87; B: *Leuconostoc mesenteroides* B19.

En los ensayos de inhibición del crecimiento de *Salmonella* spp. se observó que las cinco cepas de BAL en estudio mostraron una acción antibacteriana similar sobre este microorganismo indicador (tabla 10). Los diámetros de los halos de inhibición producidos por B87, B82, B83, B86 y B19 fueron en promedio de $21,25 \pm 2,75$ mm; $21,25 \pm 1,89$ mm; $19,50 \pm 2,64$ mm; $22,00 \pm 2,16$ mm y $19,75 \pm 1,71$ mm, respectivamente. Los análisis de varianza ANOVA no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre la actividad antimicrobiana producida por las diferentes cepas de BAL sobre *Salmonella* spp. A diferencia de estos resultados, Bhuiyan y col. (2017) reportaron cepas de lactobacilos con una menor actividad antimicrobiana sobre *Salmonella* spp., mostrando halos de inhibición inferiores a 8,00 mm de diámetro. En otro estudio, Silva y col. (2017) observaron halos de inhibición del crecimiento de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium con diámetros promedio de 9,50 y 11,70 mm, producidos en este caso por *Leuconostoc citreum* CIATEJ BI- 49.1. Es importante resaltar que las cepas de BAL en este estudio produjeron halos de inhibición del crecimiento bacteriano con diámetros del doble o mayor tamaño a los reportados por otros autores, demostrando una actividad antimicrobiana superior.

Tabla 10: Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas sobre dos cepas de *Salmonella* spp. mediante la técnica de estrías cruzadas

Cepas de <i>Salmonella</i> spp.	Valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento (mm) ± DS				
	B87	B82	B83	B86	B19
234	20,50 ± 3,53 ^a	20,50 ± 0,71 ^a	19,00 ± 1,41 ^a	20,50 ± 2,12 ^a	18,50 ± 0,71 ^a
235	22,00 ± 2,83 ^a	22,00 ± 2,83 ^a	20,00 ± 4,24 ^a	23,50 ± 0,71 ^a	21,00 ± 1,41 ^a
Promedio	21,25 ± 2,75^A	21,25 ± 1,89^A	19,50 ± 2,64^A	22,00 ± 2,16^A	19,75 ± 1,71^A

*Letras minúsculas iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición producidos por las BAL sobre las distintas cepas de *Salmonella* spp. de acuerdo al test de Tukey ($p > 0,05$). Letras mayúsculas iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre la inhibición producida por cada una de las BAL de acuerdo al test de Tukey ($p > 0,05$).

Referencias: B87: *L. lactis* B87; B82: *P. acidilactici* B82; B83: *P. acidilactici* B83; B86: *P. pentosaceus* B86; B19: *L. mesenteroides* B19.

En la tabla 11 se muestran los diámetros de los halos de inhibición promedio producidos por las BAL B87, B82, B83, B86 y B19 sobre *Shigella* spp. Los halos de inhibición producidos por B87 fueron en promedio de $25,38 \pm 1,11$ mm. En el caso de los pediococos, se observaron halos con diámetros promedio de $27,75 \pm 1,71$ mm; $20,25 \pm 1,71$ mm; y $24,13 \pm 0,85$ mm con las BAL B82, B83 y B86, respectivamente. B19 produjo halos de inhibición con diámetros promedio de $20,50 \pm 1,29$ mm. Similar a lo ocurrido con *E. coli*, la cepa B82 presentó mayor actividad inhibitoria sobre *Shigella* spp., mostrando halos con diámetros superiores a los producidos por el resto de las BAL. A diferencia de estos resultados, algunos autores reportaron halos de inhibición de menor tamaño al realizar ensayos similares, por ejemplo Noohi y col. (2016) observaron halos inferiores a 5,00 mm de diámetro producidos por diferentes cepas de *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus* sobre *Shigella flexneri*. Del mismo modo, Okoro y col. (2017) informaron halos de inhibición del crecimiento de *Shigella* spp. de 10,00 y 14,00 mm producidos por *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum*, respectivamente. Abbasiliasi y col. (2017) evaluaron la actividad inhibitoria de *P. acidilactici* Kp10 sobre *Shigella sonnei* observando halos de inhibición de 11,00 mm de diámetro, inferiores también a los obtenidos en este estudio.

Tabla 11: Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas sobre dos cepas de *Shigella* spp. mediante la técnica de estrías cruzadas

Cepas de <i>Shigella</i> spp.	Valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento (mm) ± DS				
	B87	B82	B83	B86	B19
205	25,00 ± 1,41 ^a	28,00 ± 2,83 ^a	20,50 ± 0,71 ^a	24,50 ± 0,71 ^a	21,50 ± 0,71 ^a
206	25,75 ± 1,06 ^a	27,50 ± 0,71 ^a	20,00 ± 2,83 ^a	23,75 ± 1,06 ^a	19,50 ± 0,71 ^a
Promedio	25,38 ± 1,11^{BC}	27,75 ± 1,71^C	20,25 ± 1,71^A	24,13 ± 0,85^B	20,50 ± 1,29^A

*Letras minúsculas iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición producidos por las BAL sobre las distintas cepas de *Shigella* spp. de acuerdo al test de Tukey ($p > 0,05$). Letras mayúsculas iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre la inhibición producida por cada una de las BAL de acuerdo al test de Tukey ($p > 0,05$).

Referencias: B87: *L. lactis* B87; B82: *P. acidilactici* B82; B83: *P. acidilactici* B83; B86: *P. pentosaceus* B86; B19: *L. mesenteroides* B19.

En la tabla 12 se resume la actividad antimicrobiana producida por *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82, *P. acidilactici* B83, *P. pentosaceus* B86 y *L. mesenteroides* B19 evaluada mediante la técnica de estrías cruzadas. El microorganismo más sensible a la actividad antimicrobiana de *L. lactis* B87 y *P. acidilactici* B82 fue *Shigella* spp., con halos promedio de inhibición significativamente superiores ($p < 0,05$) a los de los demás indicadores. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre la inhibición del crecimiento de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y *Salmonella* spp. producida por B87 y B82. Por otra parte, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los halos promedio de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. producidos por *L. mesenteroides* B19, indicando que estos microorganismos patógenos presentan una sensibilidad similar a la acción antibacteriana de B19. Las cepas de *S. aureus*, en cambio, fueron menos sensibles a esta BAL ya que mostraron halos promedio de inhibición significativamente inferiores ($p < 0,05$) respecto de las demás bacterias ensayadas. Finalmente, tanto *P. acidilactici* B83 como *P. pentosaceus* B86 presentaron un efecto antimicrobiano similar sobre todas las cepas bacterianas indicadoras testadas ($p > 0,05$).

Tabla 12: Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por bacterias ácido lácticas sobre diferentes microorganismos indicadores mediante la técnica de estrías cruzadas

Microorganismos indicadores	Valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento (mm) ± DS				
	B87	B82	B83	B86	B19
<i>S. aureus</i>	23,25 ± 3,04 ^a	19,67 ± 1,86 ^a	19,58 ± 2,15 ^a	21,58 ± 2,90 ^a	16,42 ± 0,66 ^a
<i>E. coli</i>	21,60 ± 1,34 ^a	22,45 ± 1,95 ^a	19,50 ± 1,37 ^a	19,50 ± 1,90 ^a	18,80 ± 0,45 ^b
<i>Salmonella spp.</i>	21,25 ± 1,06 ^a	21,25 ± 1,06 ^a	19,50 ± 0,71 ^a	22,00 ± 2,12 ^a	19,75 ± 1,77 ^b
<i>Shigella spp.</i>	25,38 ± 0,53 ^b	27,75 ± 0,35 ^b	20,25 ± 0,35 ^a	24,13 ± 0,53 ^a	20,50 ± 1,41 ^b
<i>L. monocytogenes</i>	21,50 ± 0,71 ^a	19,50 ± 0,71 ^a	21,00 ± 0,71 ^a	21,50 ± 1,41 ^a	20,00 ± 0,71 ^b

*Letras iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición producidos por las diferentes BAL sobre cada uno de los microorganismos indicadores de acuerdo al test de Tukey ($p > 0,05$).

Referencias: B87: *L. lactis* B87; B82: *P. acidilactici* B82; B83: *P. acidilactici* B83; B86: *P. pentosaceus* B86; B19: *L. mesenteroides* B19.

Cabe destacar que las cinco cepas de bacterias ácido lácticas estudiadas mostraron una significativa actividad antimicrobiana sobre todos los microorganismos patógenos ensayados. Estos hallazgos demostraron que *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82, *P. acidilactici* B83, *P. pentosaceus* B86 y *L. mesenteroides* B19 presentaron un amplio espectro de actividad inhibitoria sobre el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas. En otros estudios, Tulini y col. (2013) y Macaluso y col. (2016), al evaluar la actividad antimicrobiana producida por otras BAL sobre el crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella spp.*, no observaron actividad biológica sobre ninguno de estos microorganismos patógenos. Por otro lado, si bien Giles- Gómez y col. (2016) reportaron que *L. mesenteroides* P45 era capaz de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*, *E. coli* enteropatógena (ECEP) y *Salmonella spp.*; estos autores observaron diámetros de halos de inhibición muy pequeños (que oscilaron entre 6,50 y 8,50 mm). Los resultados hallados en este trabajo difieren considerablemente con estos autores, ya que todas las cepas de BAL ensayadas mostraron una importante actividad antimicrobiana sobre el 100% de los microorganismos indicadores evaluados, con halos de inhibición del crecimiento comprendidos entre 16,42 y 27,75 mm.

6.4. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes sin tratar y neutralizados de bacterias ácido lácticas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante la técnica de difusión en pozos

Se ensayó la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células puros (SLC) y neutralizados (SLCN) de *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82 y *L. mesenteroides* B19 sobre *S. aureus* (156 y 169) y *E. coli* (201, LAMA 543, LAMA 544) mediante la técnica de difusión en pozos.

Los resultados demostraron que los sobrenadantes puros y neutralizados de las 3 cepas de BAL presentaron actividad antimicrobiana sobre ambas cepas de *S. aureus* (figura 6). Los SLC de B87, B82 y B19 produjeron halos de inhibición del crecimiento bacteriano comprendidos entre 22,00 y 26,00 mm, con promedios de $23,50 \pm 1,96$ mm, $24,50 \pm 2,16$ mm y $24,00 \pm 2,58$ mm, respectivamente. Con respecto a los SLCN, se observaron halos de inhibición que oscilaron en un rango comprendido entre 14,00 y 22,00 mm, con promedios de $19,50 \pm 3,41$ mm, $20,00 \pm 1,63$ mm y $17,00 \pm 3,58$ mm con los SLCN las BAL B87, B82 y B19, respectivamente.

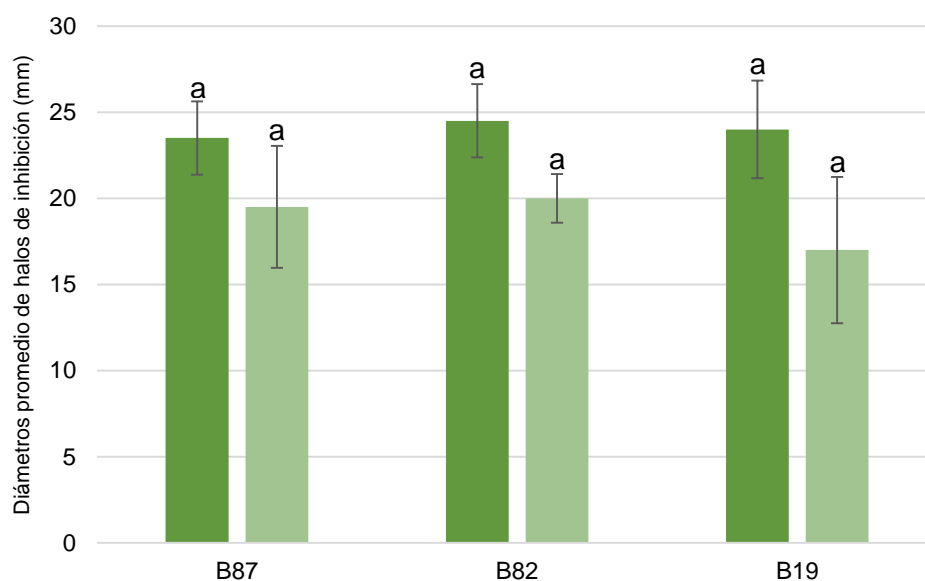


Figura 6: Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* producidos por los sobrenadantes puros y neutralizados de *Lactococcus lactis* B87, *Pediococcus acidilactici* B82 y *Leuconostoc mesenteroides* B19 mediante la técnica de difusión en pozos.

Referencias: ■ SLC: Sobrenadante libre de células. ■ SLCN: Sobrenadante libre de células neutralizado. *Letras iguales no indican diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Los análisis de varianza (ANOVA) no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los diámetros de los halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de las BAL en estudio sobre ambas cepas de *S. aureus*. Esto significa que los

sobrenadantes conservaron su actividad antimicrobiana a pesar de haber sido neutralizados, por lo tanto la capacidad inhibitoria de las BAL B87, B82 y B19 se encuentra dada en su mayoría por otras sustancias bioactivas diferentes de los ácidos orgánicos, a los cuales se les atribuye un pequeño porcentaje de la actividad.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los diámetros promedio de los halos de inhibición producidos por los SLC de B87, B82 y B19 sobre *S. aureus*. El halo promedio de mayor tamaño fue producido por el SLC de *P. acidilactici* B82 ($24,50 \pm 2,16$ mm). Los diámetros de los halos de inhibición producidos por los SLCN de las 3 cepas de BAL no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). El halo promedio de mayor tamaño también fue en este caso el del SLCN de B82 ($20 \pm 1,63$ mm).

En la figura 7 se muestran los diámetros promedio de los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* producidos por los SLC y SLCN de *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82 y *L. mesenteroides* B19. Los resultados obtenidos demostraron que los sobrenadantes puros y neutralizados de todas las cepas de BAL inhibieron el crecimiento de todas las cepas de *E. coli* ensayadas. Los diámetros de los halos producidos por los SLC de B87, B82 y B819 oscilaron en un rango comprendido entre 24,00 y 30,00 mm, con promedios de 27,00 mm, 29,00 mm y 26,00 mm, respectivamente. Por otra parte, los SLCN de estas BAL produjeron halos de inhibición del crecimiento con diámetros comprendidos entre 18,50 y 26,00 mm, observándose promedios de 25,00 mm, 24,33 mm y 20,50 mm con los SLCN de las BAL B87, B82 y B19, respectivamente.

Si bien los análisis de varianza (ANOVA) mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los diámetros de los halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de las BAL B82 y B19, los SLCN conservaron un elevado porcentaje de actividad antimicrobiana. Estos resultados sugieren que *P. acidilactici* B82 y *L. mesenteroides* B19 produjeron otros metabolitos bioactivos, diferentes a los ácidos orgánicos, que fueron responsables del 83,79% y el 78,85% de la inhibición, respectivamente. En el caso de B87, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los halos de inhibición producidos por el SLC y SLCN, lo cual indicaría que luego de eliminar la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos se mantuvo la actividad biológica. Es importante destacar que el efecto inhibitorio de las BAL en estudio se debe principalmente a la producción de otras sustancias bioactivas diferentes de los ácidos orgánicos.

Los SLC de todas las BAL estudiadas mostraron una importante actividad antimicrobiana sobre *E. coli*, siendo el SLC de *P. acidilactici* B82 el que presentó mayores halos de inhibición del crecimiento, con diferencias estadísticamente significativas

($p < 0,05$). Al comparar la actividad biológica de los SLCN de las distintas BAL, se observó que los SLCN de B87 y B82 mostraron mayor capacidad inhibitoria sobre *E. coli*, con halos promedio de inhibición de 25,00 y 24,33 mm, respectivamente.

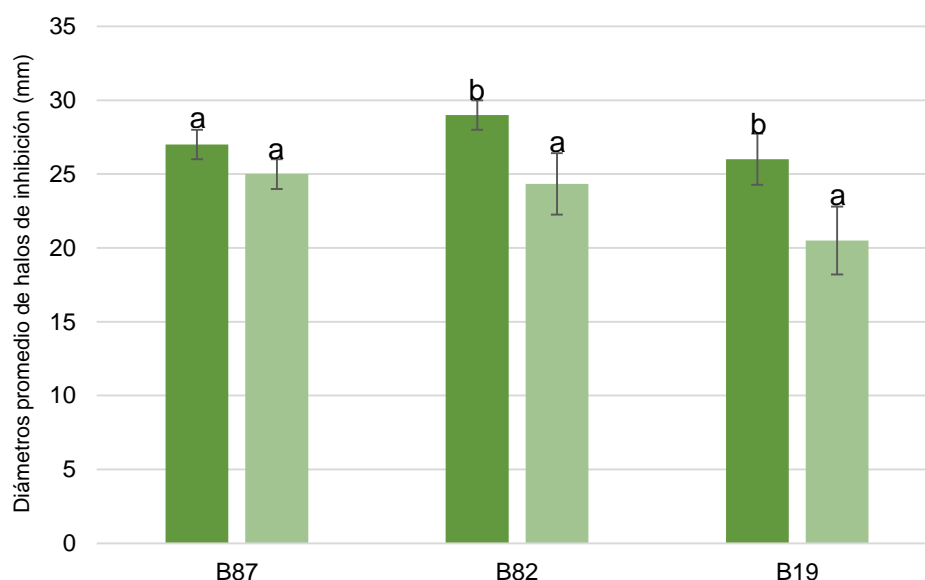


Figura 7: Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento de diferentes cepas de *Escherichia coli* producidos por los sobrenadantes puros y neutralizados de *Lactococcus lactis* B87, *Pediococcus acidilactici* B82 y *Leuconostoc mesenteroides* B19 mediante la técnica de difusión en pozos.

Referencias: ■ SLC: Sobrenadante libre de células. ■ SLCN: Sobrenadante libre de células neutralizado. *Letras iguales no indican diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Este estudio permitió determinar que los SLC y SLCN de las 3 cepas de BAL en estudio presentaron actividad antimicrobiana sobre todas las cepas indicadoras utilizadas. El mayor porcentaje de esta actividad no se atribuyó a los ácidos orgánicos producidos por las BAL, sino a otro tipo de sustancias bioactivas. Otros autores reportaron que el SLC de una cepa de *P. pentosaceus* presentó actividad antibacteriana sobre *S. aureus* y *E. coli*, aunque no observaron halos de inhibición con el sobrenadante neutralizado (Shukla y Goyal, 2013). De manera similar, Arena y col. (2016) informaron que la neutralización de los SLC de diferentes cepas de *L. plantarum* eliminó su actividad antimicrobiana sobre *E. coli* O157:H7. A diferencia de lo reportado en este trabajo, ambos estudios demostraron que la actividad inhibitoria ejercida por las bacterias estudiadas se debía a fundamentalmente a la producción de ácidos orgánicos. Además, es importante destacar que estos autores obtuvieron halos de inhibición significativamente inferiores a los obtenidos con las BAL B87, B82 y B19.

Se comparó estadísticamente la actividad ejercida por los sobrenadantes libres de células puros y neutralizados de las BAL B87, B82 y B19 sobre las dos especies indicadoras utilizadas en el ensayo (figura 8). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre los halos de inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* producidos por los SLC y SLCN de *L. mesenteroides* B19. Esto indica que ambas especies, una Gram positiva y otra Gram negativa, fueron inhibidas de manera similar por los sobrenadantes puros y neutralizados de B19. Con respecto a los SLC y SLCN de *P. acidilactici* B82 y *L. lactis* B87, los diámetros promedio de los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* fueron significativamente mayores ($p<0,05$) a los de *S. aureus*, siendo la primera especie más sensible a los metabolitos bioactivos de ambas cepas de BAL.

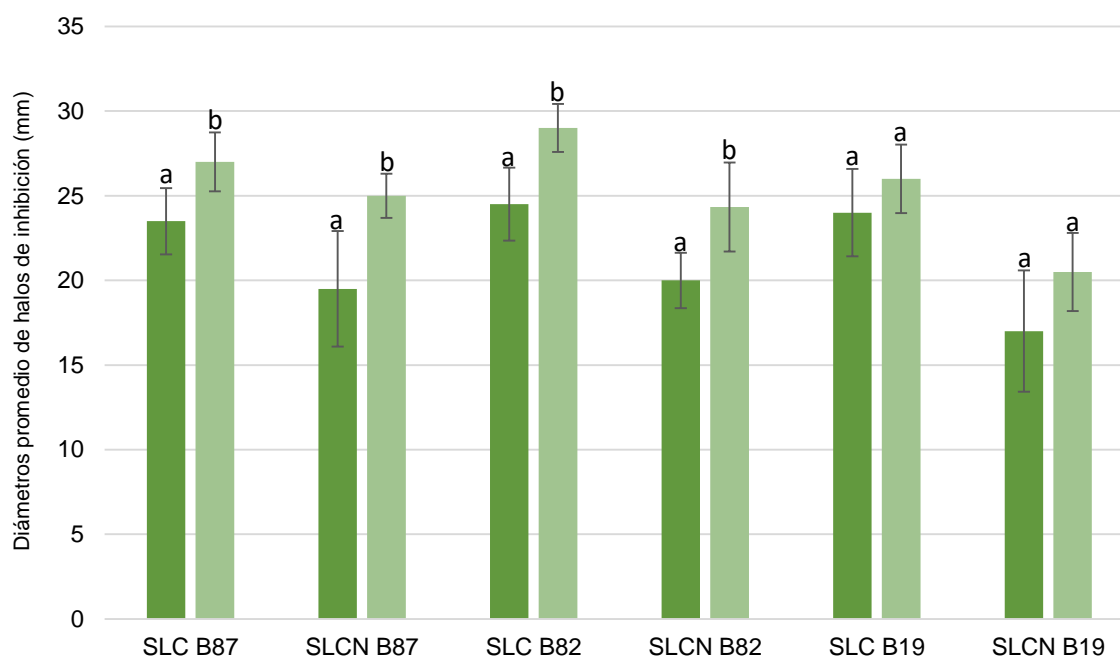


Figura 8: Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* producidos por los sobrenadantes puros y neutralizados de *Lactococcus lactis* B87, *Pediococcus acidilactici* B82 y *Leuconostoc mesenteroides* B19 mediante la técnica de difusión en pozos.

Referencias: ■ Halos de inhibición del crecimiento de *S. aureus*. ■ Halos de inhibición del crecimiento de *E. coli*. *Letras iguales no indican diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).

6.5. Caracterización de las sustancias antimicrobianas producidas por *Lactococcus lactis* B87, *Pediococcus acidilactici* B82 y *Leuconostoc mesenteroides* B19 sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica serotipo O157:H7

6.5.1. Evaluación de la sensibilidad a enzimas proteolíticas de los metabolitos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas

Para evaluar si alguno de los metabolitos antimicrobianos producidos por las BAL en estudio presentan naturaleza proteica, los SLCN puros y diluidos de cada cepa fueron tratados con tripsina. En la tabla 13 se presentan los halos de inhibición del crecimiento producidos por los SLCN tratados con tripsina y sin tratar (control) sobre *E. coli* O157:H7 (LAMA 543), obtenidos mediante la técnica de difusión en pozos.

Tabla 13: Halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* O157: H7 producidos por los SLCN de BAL tratados con tripsina y sin tratar mediante la técnica de difusión en pozos

Valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento (mm) ± DS			
Tratamientos	B87	B82	B19
SLCN (control)	14,33 ± 1,53 ^b	20,33 ± 2,08 ^b	16,00 ± 1,00 ^b
SLCN sin diluir + Tripsina	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
SLCN diluido al ½ + Tripsina	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
SLCN diluido al ¼ + Tripsina	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a

*Letras iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición producidos por los SLCN tratados con tripsina y sin tratar sobre *E. coli* LAMA 543 de acuerdo al test de Tukey ($p > 0,05$). SLCN: Sobrenadante libre de células neutralizado.

Referencias: B87: *L. lactis* B87; B82: *P. acidilactici* B82; B19: *L. mesenteroides* B19.

Los SLCN de *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82 y *L. mesenteroides* B19 sin tratar produjeron halos de inhibición del crecimiento bacteriano con diámetros de 14,33 mm, 20,33 mm y 16,00 mm, respectivamente. Los SLCN sin diluir y diluidos que fueron tratados con tripsina perdieron su actividad antimicrobiana, ya que no se observaron halos de inhibición del crecimiento (figura 9). Estos resultados permitieron demostrar que los metabolitos bioactivos producidos por las cepas de BAL fueron sensibles a la acción de la tripsina, demostrando la naturaleza proteica de los mismos.

Las bacteriocinas son por definición sustancias de naturaleza proteica y, por lo tanto, sensibles a la acción de enzimas proteolíticas. La eliminación de la actividad inhibitoria de los SLCN de las BAL ensayadas al ser tratados con enzimas proteolíticas sugiere que los metabolitos bioactivos responsables de la mayor actividad antimicrobiana son bacteriocinas o sustancias similares a bacteriocinas. Estos resultados son relevantes, ya que la producción de sustancias con actividad inhibitoria tales como bacteriocinas es una característica importante en la selección de bacterias ácido lácticas como probióticos o cultivos protectores.

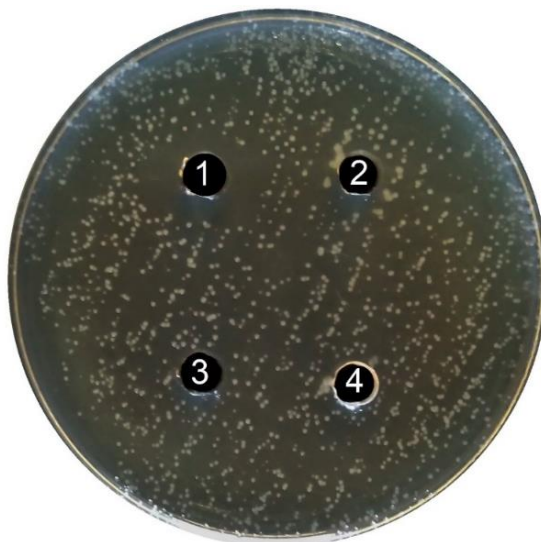


Figura 9: Halos de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* LAMA 543 producidos por el SLCN de *Leuconostoc mesenteroides* B19 puro, diluido al medio y al cuarto tratado con tripsina, y su respectivo control sin tratar.

Referencias: SLCN: Sobrenadante libre de células neutralizado. 1: SLCN de *L. mesenteroides* B19 sin tratar. 2: SLCN de *L. mesenteroides* B19 tratado con tripsina. 3: SLCN de *L. mesenteroides* B19 diluido al medio y tratado con tripsina. 4: SLCN de *L. mesenteroides* B19 diluido al cuarto y tratado con tripsina.

Estos resultados son comparables con los reportados por An y col. (2017), quienes observaron que el tratamiento con enzimas proteolíticas eliminó la actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* CMCC26003 del SLC de *Lactobacillus plantarum* M1- UVs300. Otros autores en cambio, informaron que la actividad de los metabolitos antimicrobianos producidos por otras BAL no se veía afectada luego del tratamiento con proteasas (Mariam y col., 2014; Fontes Saraiva y col., 2017).

Es de destacar la actividad inhibitoria de los metabolitos similares a bacteriocinas producidos por B87, B82 y B19, las cuales fueron capaces de inhibir el crecimiento de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7; ya que otros autores, evaluando otras bacteriocinas, no hallaron inhibición del desarrollo de ECEH (Pattanayaiying y col., 2014; Gaaloul y col., 2015).

6.5.2. Evaluación de la sensibilidad a elevadas temperaturas de los metabolitos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas

La actividad antimicrobiana de los SLC de B87, B82 y B19 sometidos a diferentes tratamientos térmicos (100 °C durante 1h y 121 °C durante 10 min) fue determinada mediante la técnica de difusión en pozos sobre *E. coli* O157:H7 (LAMA 543).

Los resultados mostraron que los SLC expuestos a elevadas temperaturas presentaron una importante actividad antimicrobiana sobre la cepa indicadora. Los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por los sobrenadantes tratados a 100 °C estuvieron comprendidos entre 24,00 y 30,00 mm, mientras que aquellos producidos por los SLC expuestos a 121 °C oscilaron entre 25,00 y 28,00 mm (figura 10). Si bien se observaron variaciones en los diámetros de los halos de inhibición producidos por los SLC de las BAL expuestos a elevadas temperaturas con respecto a los obtenidos con los SLC sin tratar, los análisis de varianza (ANOVA) no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Estos hallazgos permitieron demostrar que las sustancias similares a bacteriocinas producidas por B87, B82 y B19 mantuvieron prácticamente el 100% de su actividad biológica luego de los tratamientos térmicos.

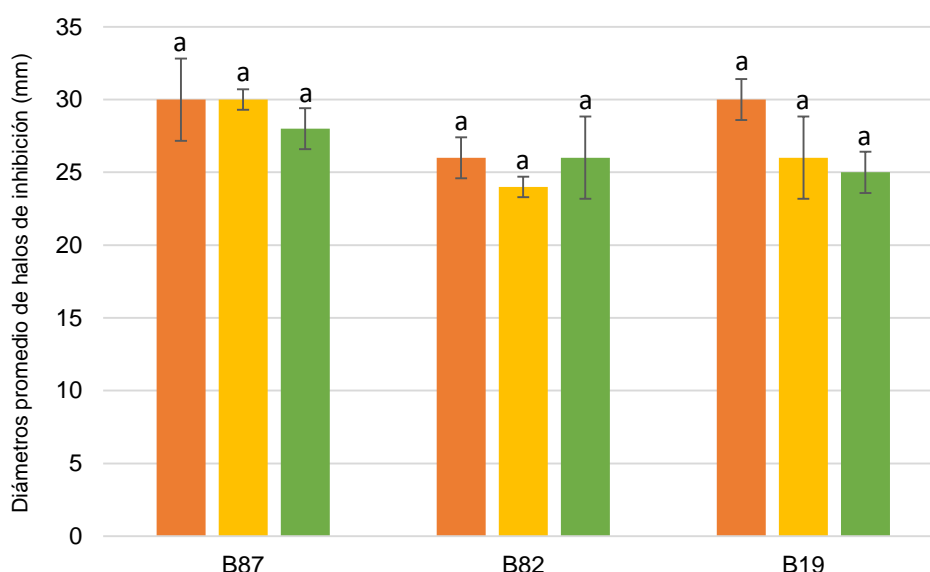


Figura 10: Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por los sobrenadantes libres de células de *Lactococcus lactis* B87, *Pediococcus acidilactici* B82 y *Leuconostoc mesenteroides* B19 sometidos a diferentes tratamientos térmicos.

Referencias: ■ SLC: Sobrenadantes libres de células (control). ■ SLC tratados a 100 °C durante 1 hora. ■ SLC tratados a 121 °C durante 10 minutos. *Letras iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición producidos por los SLC tratados y el control de cada cepa de BAL de acuerdo al test de Tukey ($p > 0,05$).

Es importante destacar que aunque la exposición a 100 °C y 121° C disminuyó la actividad antimicrobiana de los metabolitos tipo bacteriocinas producidos por *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82 y *L. mesenteroides* B19, ésta disminución no fue significativa, indicando su elevada resistencia térmica.

A diferencia de estos resultados, otros autores observaron que el tratamiento a 121 °C eliminó la actividad biológica de las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes de otras cepas de BAL (Ahn y col., 2017; Chen y col., 2017). Shi y col. (2016) observaron que la leucocina K7 producida por *L. mesenteroides* K7 perdió el 50% y 75% de su actividad inhibitoria luego de ser incubada a 100 °C durante 30 y 60 min, respectivamente mientras que el tratamiento a 121 °C eliminó toda la actividad de esta bacteriocina.

6.5.3. Evaluación de la estabilidad a diferentes valores de pH de los metabolitos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes de bacterias ácido lácticas

En este ensayo los SLC de las bacterias ácido lácticas en estudio fueron ajustados a diferentes valores de pH comprendidos en un rango entre 2 y 11 y se incubaron a 4 °C durante 5 y 15 h. Finalizado el período de incubación, se ajustó su pH a 5,5 y se ensayó la actividad antimicrobiana de los SLC tratados y los controles sin tratar mediante la técnica de difusión en pozos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 14.

Los SLC de todas las cepas de BAL ajustados a valores de pH entre 2 y 11 e incubados durante 5 horas conservaron su actividad antimicrobiana sobre *E. coli* LAMA 543, produciendo halos de inhibición del crecimiento con diámetros que oscilaron entre 12,00 y 26,50 mm. La mayor actividad inhibitoria fue producida por los SLC a valores de pH entre 2- 7; 4- 7 y 2- 7 para las cepas B87, B82 y B19, respectivamente.

Con respecto a los sobrenadantes ajustados a diferentes valores de pH incubados durante 15 horas, se observó en todos los casos una disminución en los diámetros de los halos de inhibición, principalmente a valores extremos de pH. Los SLC de *L. lactis* B87 y *P. acidilactici* B82 conservaron su actividad antimicrobiana en un rango de pH entre 2 y 9, observándose la pérdida de su actividad inhibitoria sólo a pH 11. Por otra parte, el SLC de *L. mesenteroides* B19 presentó actividad inhibitoria en un rango de pH comprendido entre 2 y 11, con halos de inhibición que oscilaron entre 15,00 y 21,00 mm. Estos hallazgos permitieron comprobar que aún cuando se prolongó el tiempo de incubación de los SLC ajustados a diferentes valores de pH, los mismos mantuvieron su actividad inhibitoria en un amplio rango de pH.

Estos resultados son muy importantes ya que demostraron que las sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica presentes en los sobrenadantes de *L. lactis* B87,

P. acidilactici B82 y *L. mesenteroides* B19 conservaron su efecto inhibitorio aún a pH muy ácidos o muy básicos, siendo óptima su acción biológica a pH entre 4 y 7.

En contraste con los resultados hallados en este trabajo, Dündar y col. (2015) observaron que la mesentericina W3 producida por *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* W3 era activa a valores de pH entre 2 y 7, perdiendo su efecto antimicrobiano por encima de estos. Otros autores reportaron que la incubación de bacteriocinas producidas por otras BAL a pH alcalino eliminó su actividad (Mandal y col., 2011; Chavan y col., 2016). En otro estudio, Kumar y col. (2016) informaron que la bacteriocina presente en el sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* LD4 perdió el 30% y 60% de su actividad al ser incubada durante 2 h a pH 6 y 7, respectivamente. Estos autores no observaron actividad antimicrobiana a valores de pH superiores a 7. Por último, Murtaza y col. (2012) publicaron que una bacteriocina producida por *L. lactis* subsp. *lactis* perdió su actividad a pH 3,8 y su máxima acción biológica fue a valores de pH ligeramente ácidos (entre 5,3 y 6,8).

La actividad elevada resistencia de los metabolitos producidos por B87, B82 y B19 en un amplio rango de pH (entre 2 y 11) observada en este trabajo difiere considerablemente de lo reportado por esos autores, quienes describieron bacteriocinas con actividad inhibitoria en un rango muy reducido de pH. Es de destacar que las sustancias tipo bacteriocinas producidas por todas las BAL en este estudio conservaron su actividad antimicrobiana, lo cual es una importante característica tecnológica de estos compuestos y puede contribuir a la efectividad de las cepas productoras como probióticos.

Tabla 14: Actividad antimicrobiana de sustancias bioactivas producidas por bacterias ácido lácticas incubadas a diferentes valores de pH durante 5 y 15 horas

Valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento (mm) ± DS						
Valores de pH	B87		B82		B19	
	5 horas	15 horas	5 horas	15 horas	5 horas	15 horas
Control	23,00 ± 1,41 ^c	20,00 ± 1,41 ^c	23,00 ± 1,41 ^d	20,50 ± 2,12 ^c	25,00 ± 1,41 ^{bc}	19,00 ± 1,41 ^{ab}
pH 2	21,50 ± 2,12 ^c	19,00 ± 1,41 ^{bc}	17,00 ± 1,41 ^{abc}	18,50 ± 0,71 ^{bc}	22,50 ± 2,12 ^{bc}	16,00 ± 1,41 ^{ab}
pH 4	21,00 ± 1,41 ^c	19,50 ± 1,41 ^{bc}	20,50 ± 0,71 ^{cd}	20,00 ± 1,41 ^{bc}	25,50 ± 0,71 ^{bc}	21,00 ± 1,41 ^b
pH 5	24,00 ± 1,41 ^c	19,50 ± 2,12 ^{bc}	22,00 ± 1,41 ^d	20,00 ± 0,71 ^{bc}	26,50 ± 0,71 ^c	19,50 ± 2,12 ^{ab}
pH 7	19,00 ± 1,41 ^{bc}	17,50 ± 0,71 ^{bc}	20,00 ± 1,41 ^{bcd}	17,00 ± 1,41 ^{bc}	23,00 ± 1,41 ^{bc}	16,00 ± 0,71 ^{ab}
pH 9	14,50 ± 0,71 ^{ab}	14,50 ± 0,71 ^b	15,50 ± 0,71 ^{ab}	15,50 ± 0,71 ^b	21,50 ± 0,71 ^b	15,00 ± 1,41 ^a
pH 11	12,00 ± 1,41 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	14,50 ± 0,71 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	16,50 ± 0,71 ^a	15,50 ± 0,71 ^{ab}

*Letras iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición producidos por los SLCN tratados a diferentes valores de pH y los controles sin tratar sobre *E. coli* LAMA 543 de acuerdo al test de Tukey (p>0,05).

Referencias: B87: *L. lactis* B87; B82: *P. acidilactici* B82; B19: *L. mesenteroides* B19.

6.5.4. Evaluación de sensibilidad al tratamiento con urea de los metabolitos antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas

Se evaluó la sensibilidad de las bacteriocinas producidas por las BAL en estudio frente al tratamiento con urea a una concentración final de 1% (p/v). Los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por los SLCN tratados con urea y los controles sin tratar se muestran en la figura 11.

Se observó que tanto los SLCN tratados con urea como los controles sin tratar presentaron actividad antimicrobiana sobre la cepa indicadora *E. coli* LAMA 543. Los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por los SLCN tratados con urea oscilaron entre 25,66 y 26,33 mm de diámetro y no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) con los diámetros de los halos de inhibición producidos por los controles sin tratamiento.

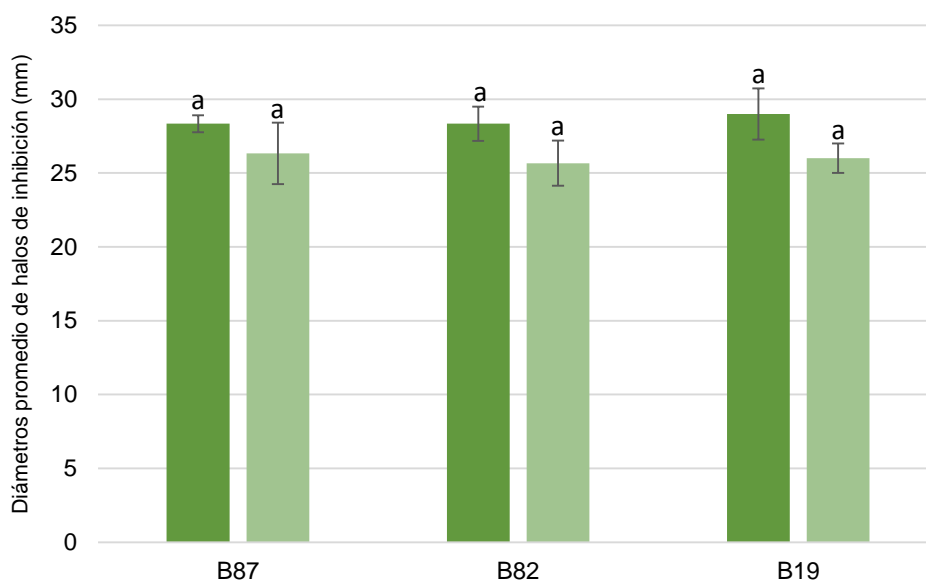


Figura 11: Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por los sobrenadantes neutralizados de *Lactococcus lactis* B87, *Pediococcus acidilactici* B82 y *Leuconostoc mesenteroides* B19 tratados con urea al 1% y sus respectivos controles sin tratar.

Referencias: ■ SLCN: Sobrenadantes neutralizados sin tratar (control). ■ SLCN tratados con urea al 1%.

*Letras iguales no indican diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición producidos por los SLCN tratados y el control de cada cepa de BAL de acuerdo al test de Tukey ($p > 0,05$).

Los resultados obtenidos en esta experiencia permitieron comprobar que la acción biológica de las sustancias antimicrobianas producidas por *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82, y *L. mesenteroides* B19 no se vió afectada por la presencia de urea en el medio.

Resultados similares fueron publicados por Vidhyasagar y Jeevaratnam (2013), quienes observaron que la bacteriocina producida por *Pediococcus pentosaceus* VJ13 conservó su actividad luego del tratamiento con urea. Kaur y Tiwari (2015) informaron que el efecto antimicrobiano de las bacteriocinas producidas por *Pediococcus pentosaceus* LB44 y *Weissella confusa* LM85 no se vió afectado por la presencia de urea. Otros autores, a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, observaron que el sobrenadante de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* perdió el 100% de su actividad biológica al ser tratado con urea (Aslam y col., 2012).

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas puede deberse a la acción de un único péptido, o bien a la acción complementaria de dos péptidos heterogéneos, siendo la urea capaz de disociar la unión entre los mismos. Con respecto a las bacteriocinas de dos componentes, en algunos casos es necesaria la presencia de ambos péptidos para detectar actividad, mientras que en otros estudios se ha observado que cada uno de los ellos posee actividad antimicrobiana por separado y su acción complementaria permite una ligera intensificación de la misma (Tahara y col., 1996). En base a estos antecedentes, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las sustancias tipo bacteriocinas presentes en los SLCN de las BAL deben su actividad inhibitoria a un único péptido, o bien a un dipéptido que en caso de ser disociado por urea, cada uno de sus componentes conserva su actividad.

6.6. Modo de acción de los metabolitos antimicrobianos producidos por *Lactococcus lactis* B87, *Pediococcus acidilactici* B82 y *Leuconostoc mesenteroides* B19 sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica serotipo O157:H7

La determinación del modo de acción de las sustancias bioactivas producidas por *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82 y *L. mesenteroides* B19 se evaluó mediante mediciones del crecimiento de *E. coli* LAMA 543 (serotipo O157:H7) cuando fue cultivada en presencia de los SLCN de B87, B82 y B19.

En la figura 12 se observa el crecimiento de *E. coli* LAMA 543 determinado mediante mediciones de absorbancia a 600 nm a lo largo del tiempo. Los SLCN fueron añadidos a los cultivos del microorganismo indicador en el inicio de su fase de crecimiento exponencial, que en este caso correspondió a las 4 horas de incubación (indicado con una flecha).

Los resultados obtenidos mostraron que el cultivo control de *E. coli* O157:H7 sin sobrenadantes presentó un crecimiento exponencial entre las 4 y 8 h de incubación, alcanzando una absorbancia máxima de 1,4 a las 9 h de incubación. Por otra parte, el agregado del SLCN conteniendo el metabolito tipo bacteriocina de *L. mesenteroides* B19

produjo un considerable retraso del crecimiento bacteriano, mostrando máximos valores de DO de 0,4 a las 24 h, lo cual representa una disminución de la población bacteriana del 72,41% con respecto al control. Los cultivos de *E. coli* adicionados con los SLCN de *L. lactis* B87 y *P. acidilactici* B82 mostraron valores de absorbancia constantes durante toda la experiencia, es decir que no se observó aumento en la población bacteriana. Estos hallazgos sugieren que las sustancias tipo bacteriocinas producidas por las cepas B87 y B82 presentan una mayor actividad antimicrobiana sobre *E. coli* que la producida por *L. mesenteroides* B19.

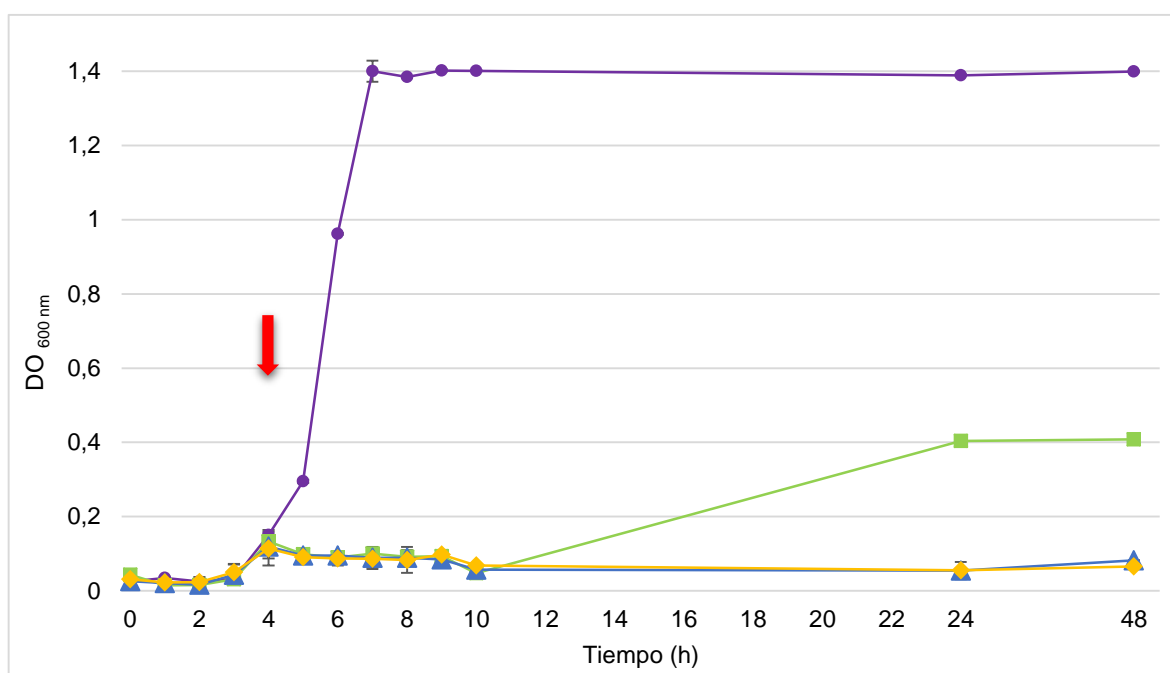


Figura 12: Efecto de las bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis* B87, *Pediococcus acidilactici* B82 y *Leuconostoc mesenteroides* B19 sobre *Escherichia coli* O157:H7.

Referencias: —●— *E. coli* LAMA 543; —◆— *E. coli* LAMA 543+SLCN B87; —▲— *E. coli* LAMA 543+SLCN B82; —■— *E. coli* LAMA 543+SLCN B19.

Con respecto al recuento de células viables, el control sin bacteriocinas alcanzó su valor máximo a las 8 h de incubación con recuentos de $1,44 \times 10^9$ UFC/ml, que corresponden a 9,16 log UFC/ml (figura 13). El agregado de la sustancia antimicrobiana de naturaleza proteica producida por *L. mesenteroides* B19 llevó a un importante retraso del crecimiento de *E. coli*, registrándose recuentos máximos de $1,47 \times 10^7$ UFC/ml (7,17 log UFC/ml) a las 24 h, resultados compatibles con las mediciones de DO anteriormente descritas. La adición de los metabolitos tipo bacteriocinas producidos por las cepas B87 y B82 a los cultivos produjo una reducción de 4,82 y 3,55 log UFC/ml, respectivamente, a las 24 h de incubación. Es importante destacar que las sustancias tipo bacteriocinas presentes en los

sobrenadantes de las cepas B87 y B82 lograron reducir los recuentos bacterianos, siendo inferiores al límite de detección a las 48 h en el ensayo con B87.

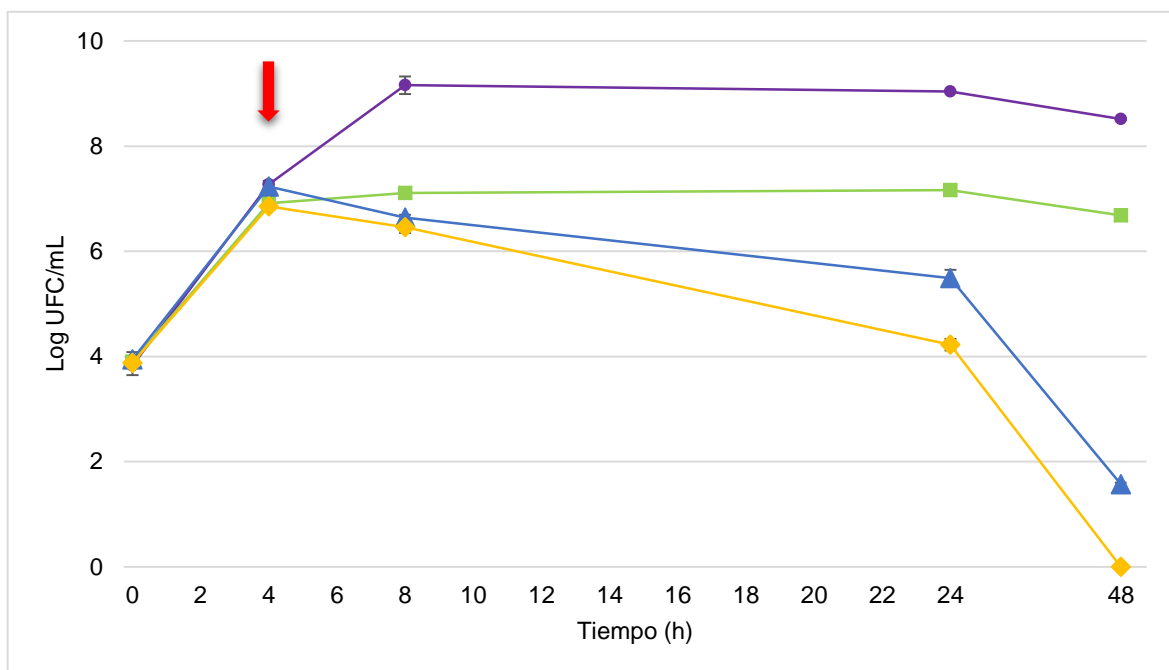


Figura 13: Efecto de las bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis* B87, *Pediococcus acidilactici* B82 y *Leuconostoc mesenteroides* B19 sobre *Escherichia coli* O157:H7.

Referencias: —●— *E. coli* LAMA 543; —◆— *E. coli* LAMA 543+SLCN B87; —▲— *E. coli* LAMA 543+SLCN B82; —■— *E. coli* LAMA 543+SLCN B19.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron comprobar que la sustancia tipo bacteriocina producida por *L. mesenteroides* B19 produjo un retraso significativo en el crecimiento de *E. coli* LAMA 543, revelando un modo de acción bacteriostático sobre la misma. Por otro lado, las sustancias similares a bacteriocinas producidas por *L. lactis* B87 y *P. acidilactici* B82 lograron una importante inhibición del crecimiento, demostrando tener un efecto bactericida.

Estos resultados son relevantes, especialmente los observados con las bacteriocinas producidas por *L. lactis* B87 y *P. acidilactici* B82, las cuales mostraron un modo de acción bactericida sobre *E. coli* O157:H7. Se han descrito bacteriocinas con modo de acción bacteriostático como curvaticina DN317 (Zommiti y col., 2016), plantaricina producida por *Lactobacillus plantarum* MBSa4 (Barbosa y col., 2016) y otras con modo de acción bactericida como pentocina JL- 1 (Jiang y col., 2017), plantaricina K25 (Wen y col., 2015) y la bacteriocina LXA (Yi y col., 2016), pero ninguna con modo de acción bactericida sobre *E. coli* enterohemorrágica O157:H7.

7. Conclusiones

7. CONCLUSIONES

- Las cepas *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82, *P. acidilactici* B83, *P. pentosaceus* B86 y *L. mesenteroides* B19 presentaron actividad antimicrobiana sobre *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. mostrando halos de inhibición que evidenciaron un considerable efecto inhibitorio sobre estos microorganismos patógenos.
- La actividad antimicrobiana ejercida por las cepas de BAL se atribuyó principalmente a sustancias bioactivas diferentes de los ácidos orgánicos.
- Los metabolitos presentes en los SLCN de *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82 y *L. mesenteroides* B19 fueron sensibles a la acción de la tripsina, revelando su naturaleza proteica, característica de bacteriocinas o sustancias similares a bacteriocinas.
- La exposición a elevadas temperaturas no afectó la capacidad inhibitoria de las sustancias tipo bacteriocina producidas por las cepas de BAL en estudio.
- Los metabolitos antimicrobianos de naturaleza proteica fueron estables en un amplio rango de pH, mostrando su máxima actividad en valores ácidos y en la neutralidad.
- El tratamiento con urea no modificó la acción biológica de las bacteriocinas presentes en los SLCN de *L. lactis* B87, *P. acidilactici* B82 y *L. mesenteroides* B19, sugiriendo que la estructura de estas sustancias consiste en un único péptido, o en un dipéptido cuyas partes conservan su actividad a pesar de ser disociado por urea.
- Las bacteriocinas producidas por *L. lactis* B87 y *P. acidilactici* B82 mostraron un modo de acción bactericida sobre *E. coli* O157:H7, mientras que la bacteriocina producida por *L. mesenteroides* B19 ejerció un efecto bacteriostático.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que las cepas de BAL estudiadas presentan un amplio espectro de actividad inhibitoria que abarcaría bacterias Gram positivas y Gram negativas. La mayor parte de su efecto antibacteriano se atribuyó a sustancias de naturaleza proteica tipo bacteriocina, las cuales presentan características tecnológicas importantes para su potencial aplicación.

8. Referencias bibliográficas

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasiliasi S, Tan JS, Bashokouh F, Tengku Ibrahim TA, Mustafa S, Vakhshiteh F, Sivasambo S, Ariff AB (2017) *In vitro* assessment of *Pediococcus acidilactici* Kp10 for its potential use in the food industry. *BMC Microbiology*; doi: 10.1186/s12866-017-1000-z.
- Abengózar MA, Cebrián R, Saugar JM, Gárate T, Valdivia E, Martínez- Bueno M, Maqueda M, Rivas L (2017) The enterocin AS- 48 as an evidence for the use of bacteriocins as new leishmanicidal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; doi: 10.1128/AAC.02288-16.
- Ahmad V, Khan MS, Sajid Jamal QM, Alzohairy MA, Al Karaawi MA, Siddiqui MU (2017) Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49: 1- 11.
- Ahn H, Kim J, Kim WJ (2017) Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. *Food Control* 80: 59- 66.
- Alegría A, González P, Delgado S, Flórez AB, Hernández- Barranco AM, Rodríguez A, Mayo B (2016) Characterization of the technological behaviour of mixtures of mesophilic lactic acid bacteria isolated from traditional cheeses made of raw milk without added starters. *International Journal of Dairy Technology*; doi: 10.1111/1471-0307.12253.
- Alvarez- Sieiro P, Montalbán- López M, Mu D, Kuipers OP (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*; doi: 10.1007/s00253-016-7343-9.
- An Y, Wang Y, Liang X, Yi H, Zuo Z, Xu X, Zhang D, Yu C, Han X (2017) Purification and partial characterization of M1- UVs300, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented sausage. *Food Control*; doi: 10.1016/j.foodcont.2017.05.030.
- Anjum N, Maqsood S, Masud T, Ahmad A, Momin A (2014) *Lactobacillus acidophilus*: characterization of the species and application in food production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; doi: 10.1080/10408398.2011.621169.
- Arakawa K, Yoshida S, Aikawa H, Hano C, Bolormaa T, Burenjargal S, Miyamoto T (2015) Production of a bacteriocin- like inhibitory substance by *Leuconostoc mesenteroides*

- subsp. *dextranicum* 213M0 isolated from mongolian fermented mare milk, airag. *Animal Science Journal*; doi: 10.1111/asj.12445.
- Arena MP, Silvain A, Normanno G, Grieco F, Drider D, Spano G, Fiocco D (2016) Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio- control strategy against food- borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in microbiology*; doi: 10.3389/fmicb.2016.00464.
- Aslam M, Shahid M, Rehman F, Murtaza MA, Sharif S, Ata A, Noor S (2012) Production optimization and characterization of a low molecular weight bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *African Journal of Microbiology Research* 6 (30): 5924- 5933.
- Asurmendi P, García MJ, Pascual L, Barberis L (2015) Biocontrol of *Listeria monocytogenes* by lactic acid bacteria isolated from brewer's grains used as feedstuff in Argentina. *Journal of Stored Products Research*; doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2015.02.001>.
- Asurmendi P, García MJ, Ruíz F, Dalcerro A, Pascual L, Barberis L (2016) Biological control of AFB1- producing *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from brewer's grains, alternative feed intended for swine production in Argentina. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*; doi: 10.1080/03601234.2016.1159460.
- Asurmendi P, Pascual L, Dalcerro A, Barberis L (2014) Incidence of lactic acid bacteria and *Aspergillus flavus* in brewer's grains and evaluation of potential antifungal activity of these bacteria. *Journal of Stored Products Research* 56: 33- 37.
- Avaiyarasi ND, Ravindran AD, Venkatesh P, Arul V (2016) In vitro selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. *Food Control* 69: 124- 133.
- Bakhtiary A, Cochrane SA, Mercier P, McKay RT, Miskolzie M, Sit CS, Vederas JC (2017) Insights into the mechanism of action of the two- peptide lantibiotic lacticin 3147. *Journal of the American Chemical Society*; doi: 10.1021/jacs.7b04728.
- Balay DR, Dangeti RV, Kaur K, McMullen LM (2017) Purification of leucocin A for use on wieners to inhibit *Listeria monocytogenes* in the presence of spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*; doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.016.
- Barbosa MS, Todorov SD, Ivanova IV, Belguesmia Y, Choiset Y, Rabesona H, Chobert JM, Haertlé T, Franco BDGM (2016) Characterization of a two- peptide plantaricin

- produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolated from brazilian salami. *Food Control* 60:103- 112.
- Ben Lagha A, Haas B, Gottschalk M, Grenier D (2017) Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary Research*; doi: 10.1186/s13567-017-0425-6.
- Bermudez- Brito M, Plaza- Díaz J, Muñoz- Quezada S, Gómez- Llorente C, Gil A (2012) Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism* 61: 160- 174.
- Bhuiyan R, Shill S, Islam A, Chakraborty S (2017) Screening of *Lactobacillus* spp. from raw goat milk showing probiotic activities against pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research* 11 (15): 620- 625.
- Borrero J, Kelly E, O'Connor PM, Kelleher P, Scully C, PD Cotter, Mahony J, van Sinderena D (2018) Purification, characterization and heterologous production of plantaricyclin 2 A, a novel circular bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NI326. *Applied and Environmental Microbiology*; doi: 10.1128/AEM.01801-17.
- Bosma EF, Forster J, Nielsen AT (2017) Lactobacilli and pediococci as versatile cell factories- evaluation of strain properties and genetic tools. *Biotechnology Advances*; doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.04.002.
- Butel MJ (2014) Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et maladies infectieuses*; doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2013.10.002>.
- Castro- Rodríguez D, Hernández- Sánchez H, Yáñez Fernández J (2015) Probiotic properties of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from aguamiel of *Agave salmiana*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*; doi: 10.1007/s12602-015-9187-5.
- Chaucheyras- Durand F, Durand H (2010) Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes*; doi: 10.3920/BM2008.1002.
- Chavan A, Rameshwar D, Dange A, Wayde J, Bansal M (2016) Molecular characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fermented food “idli”. *International Journal of Food and Fermentation Technology* 6 (2): 415- 420.
- Chen Y, Wu H, Kuo C, Chen Y, Ho S, Yanagida F (2017) Leucocin C- 607, a novel bacteriocin from the multiple- bacteriocin- producing *Leuconostoc pseudomesenteroides* 607 isolated from persimmon. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*; doi: 10.1007/s12602-017-9359-6.

- Cizeikiene D, Juodeikiene G, Paskevicius A, Bartkiene E (2013) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control* 31: 539- 545.
- Cotter PD, Ross P, Hill C (2013) Bacteriocins- a viable alternative to antibiotics?. *Nature Reviews Microbiology*; doi: 10.1038/nrmicro2937.
- Crowley S, Mahony J, van Sinderen D (2013) Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio- preservatives. *Trends in Food Science and Technology* 33: 93- 109
- Daliri EBM, Lee BH (2015) New perspectives on probiotics in health and disease. *Food Science and Human Wellness*; doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2015.06.002>.
- Daniele M, Ruiz F, Pascual L, Barberis L (2011) *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* sensitivity to bacteriocins produced by two lactobacilli strains. *Current Microbiology* 63: 360- 5.
- Desbois AP, Smith VJ (2010) Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1629- 1642.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2011) InfoStat versión 2011, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- Dlamini ZC, Langa RLS, Aiyegoro OA, Okoh AI (2017) Effects of probiotics on growth performance, blood parameters, and antibody stimulation in piglets. *South African Journal of Animal Science* 47 (6): 766- 775.
- Douillard FP, de Vos WM (2014) Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microbial Cell Factories*; doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S8.
- Dündar H, Atakay M, Çelikbiçak Ö, Salih B, Bozoğlu F (2014) Comparison of two methods for purification of enterocin B, a bacteriocin produced by *Enterococcus Faecium* W3. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*; doi: 10.1080/10826068.2014.958165.
- Dündar H, Salih B, Bozoğlu F (2015) Purification and characterization of a bacteriocin from an oenological strain of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. cremoris. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*; doi: 10.1080/10826068.2015.1031395.
- Evivie SE, Huo GC, Igene JO, Bian X (2017) Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food and Nutrition Research*; doi: 10.1080/16546628.2017.1318034.

- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization) (2001) Posting date regulatory and clinical aspects of dairy probiotics. Food and Agriculture Organization of United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. Food and Agriculture Organization of United Nations and World Health Organization Working Group (online); <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2016018288>.
- Fenner S, Wilson ZE, Ley SV (2016) The total synthesis of the bioactive natural product plantazolicin A and its biosynthetic precursor plantazolicin B. *Chemistry: A European Journal*; doi :10.1002/chem.201603157.
- Ferguson RMW, Merrifield DL, Harper GM, Rawling MD, Mustafa S, Picchiatti S, Balcázar JL, Davies SJ (2010) The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on- growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*; doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04713.x.
- Fontes Saraiva MA, Brede DA, Nes IF, Baracat- Pereira MC, Vieira de Queiroz M, Alencar de Moraes C (2017) Purification and characterization of two new cell- bound bioactive compounds produced by wild *Lactococcus lactis* strain. *FEMS Microbiology Letters*; doi: 10.1093/femsle/fnx130.
- Gaaloul N, Braiek Ob, Hani K, Volski A, Chikindas ML, Ghrairi T (2015) Isolation and characterization of large spectrum and multiple bacteriocin- producing *Enterococcus faecium* strain from raw bovine milk. *Journal of Applied Microbiology*; doi: 10.1111/jam.12699.
- Gabrielsen C, Brede DA, Nes IF, Diepb DB (2014) Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *American Society for Microbiology*; doi:10.1128/AEM.02284-14.
- Gänzle MG (2015) Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*; doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>.
- García- Hernández Y, Pérez- Sánchez T, Boucourt R, Balcázar JL, Nicoli JR, Silva JM, Rodríguez Z, Fuertes H, Nuñez O, Albelo N, Halaihel N (2016) Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Reserch in Veterinary Science*; doi: 10.1016/j.rvsc.2016.08.00.
- Gautam N, Sharma N, Ahlawat OP (2013) Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* UN isolated from dhulliachar: a traditional food product of north east India. *Indian Journal of Microbiology* 54 (2): 185- 189.

- Ge J, Sun Y, Xin X, Wang Y, Ping W (2016) Purification and partial characterization of a novel bacteriocin synthesized by *Lactobacillus paracasei* HD1- 7 isolated from chinese sauerkraut juice. *Scientific Reports*; doi: 10.1038/srep19366.
- Gerbaldo G, Pereyra CM, Cavaglieri LR, Ruiz F, Pascual L, Dalcerro AM, Barberis IL (2011) Surveillance of aflatoxin and microbiota related to brewer's grain destined for swine feed in Argentina. *Veterinary Medicine International*; doi: 10.4061/2011/912480.
- Gerbaldo GA (2013) Estudio in vitro de la actividad inhibitoria de bacterias ácido lácticas aisladas de la flora autóctona de cereales fermentados sobre hongos productores de Aflatoxinas B1, tesis doctoral. UNRC. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Gharsallaoui A, Oulahal N, Joly C, Degraeve P (2015) Nisin as a food preservative part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity and main uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; doi: 10.1080/10408398.2013.763765.
- Giles-Gómez M, Sandoval García JG, Matus V, Campos Quintana I, Bolívar F, Escalante A (2016) *In vitro* and *in vivo* probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a mexican traditional alcoholic beverage. *Springer Plus*; doi: 10.1186/s40064-016-2370-7.
- Gogineni VK, Morrow LE, Malesker MA (2013) Probiotics: mechanisms of action and clinical applications. *Probiotics and health*; doi: 10.4172/2329-8901.100010.
- Gueimonde M, Sánchez B, de los Reyes- Gavilán CG, Margolles A (2013) Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in microbiology*; doi: 10.3389/fmicb.2013.00202.
- Gupta A, Sharma N (2017) Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria- *Pediococcus acidilactici* Ch- 2 isolated from chuli- a traditional apricot product of himalayan region for the production of novel bioactive compounds with special therapeutic properties. *Journal of Food: Microbiology, Safety and Hygiene*; doi: 10.4172/2476-2059.1000119.
- Hemarajata P, Versalovic J (2013) Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 6 (1): 39- 51.
- Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW, Tagg JR (2007) The diversity of bacteriocin in Gram positive bacteria. Riley MA y Chavan MA. *Bacteriocins Ecology and Evolution*; 45- 92.

- Hossain MI, Sadekuzzaman M, Ha SD (2017) Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: a review. *Food Research International*; doi: 10.1016/j.foodres.2017.07.077.
- Huys G, Botteldoorn N, Delvigne F, De Vuyst L, Heyndrickx M, Pot B, Dubois JJ, Daube G (2013) Microbial characterization of probiotics- advisory report of the working group “8651 probiotics” of the belgian Superior Health Council (SHC). *Molecular Nutrition and Food Research* 57: 1479- 504.
- Hwanhlem N, Ivanova T, Haertlé T, Jaffrés E, Dousset X (2017) Inhibition of food- spoilage and foodborne pathogenic bacteria by a nisin Z- producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L. *Food Science and Technology* 82: 170- 175.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods), 1996. *Microbiología de los Alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Jabbari V, Mokarram RR, Khiabani MS, Askari F, Ahmadi E, Hassanzadeh AM, Aghazadeh SB, Asgharzadeh M, Kafil HS (2017) Molecular identification of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic potential from traditional doogh samples and evaluation of their antimicrobial activity against some pathogenic bacteria. *Biomedical Research* 28 (4): 1458- 1463.
- Jeon HH, Kim KH, Chun BH, Ryu BH, Han NS, Jeon CO (2017) A proposal of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *jonggajibkimchii* subsp. nov. and reclassification of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *suionicum* as *Leuconostoc suionicum* sp. nov. based on complete genome sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67: 2225- 2230.
- Jiang H, Zou J, Cheng H, Fang J, Huang G (2017) Purification, characterization and mode of action of pentocin JL- 1, a novel bacteriocin isolated from *Lactobacillus pentosus*, against drug- resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*; doi: 10.1155/2017/7657190.
- Kahouli I, Tomaro- Duchesneau C, Prakash S (2013) Probiotics in colorectal cancer (CRC) with emphasis on mechanisms of action and current perspectives. *Journal of Medical Microbiology*; doi: 10.1099/jmm.0.048975-0.
- Kanmani P, Kumar RS, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul V (2013) Probiotics and its functionally valuable products- a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53 (6): 641- 658.
- Karpiński TM, Szkaradkiewicz AK (2013) Characteristic of bacteriocines and their application. *Polish Journal of Microbiology* 62 (3): 223- 235.

- Kaškonienė V, Stankevičius M, Bimbraitė- Survilienė K, Naujokaitytė G, Šernienė L, Mulkytė K, Malakauskas M, Maruška A (2017) Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*; doi: 10.1007/s00253-017-8088-9.
- Kaur R, Tiwari SK (2015) Isolation, identification and characterization of *Pediococcus pentosaceus* LB44 and *Weissella confusa* LM85 for the presence of Bacteriocin-Like Inhibitory Substances (BLIS). *Microbiology* 85 (5): 540- 547.
- Khan H, Flint SH, Yu PL (2013) Determination of mode of action of enterolysin A, produced by *Enterococcus faecalis* B9510. *Journal of Applied Microbiology* 115 (2): 484- 94.
- Kjos M, Nes IF, Diep DB (2011) Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (10): 3335- 3342.
- Kothari D, Tingirikari JMR, Goyal A (2015) *In vitro* analysis of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1426 for functional food application. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 6 (2): 55- 61.
- Kumar V, Sheoran P, Gupta A, Yadav J, Kumar Tiwari S (2016) Antibacterial property of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LD4 isolated from a fermented food. *Annals of Microbiology*; doi: 10.1007/s13213-016-1230-6.
- Lačanin I, Mounier J, Pawtowski A, Dušková M, Kameník J, Karpíšková R (2017) Assessment of the antifungal activity of *Lactobacillus* and *Pediococcus* spp. for use as bioprotective cultures in dairy products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; doi:10.1007/s11274-017-2354-y.
- Lear S, Munshi T, Hudson AS, Hatton C, Clardy J, Mosely JA, Bull TJ, Sit CS, Cobb SL (2016) Total chemical synthesis of lassomycin and lassomycin- amide. *Organic and Biomolecular Chemistry*; doi: 10.1039/C6OB00631K.
- Linares DM, Gómez C, Renes E, Fresno JM, Tornadijo ME, Ross RP, Stanton C (2017) Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health- promoting dairy foods. *Frontiers in microbiology*; doi: 10.3389/fmicb.2017.00846.
- Lv X, Lin Y, Jie Y, Sun M, Zhang B, Ba F, Zhao H, Li J (2017) Purification, characterization, and action mechanism of plantaricin DL3, a novel bacteriocin against *Pseudomonas aeruginosa* produced by *Lactobacillus plantarum* DL3 from Chinese Suan- Tsai. *European Food Research and Technology* 244 (2): 323- 331.

- Lyhs U, Snauwaert I, Pihlajaviita S, De Vuyst L, Vandamme P (2015) *Leuconostoc rapi* sp. nov., isolated from sous- vide- cooked rutabaga. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 2586- 2590.
- Macaluso G, Fiorenza G, Gaglio R, Mancuso I, Scatassa ML (2016) *In vitro* evaluation of bacteriocin like inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated during traditional sicilian cheese making. *Italian Journal of Food Safety*; doi: 10.4081/ijfs.2016.5503.
- Mahmoudi I, Moussa OB, Khaldi TEM, Kebouchi M, Soligot- Hognon C, Leroux Y, Hassouna M (2016) Functional *in vitro* screening of *Lactobacillus* strains isolated from tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic. *Small Ruminant Research*; doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.03.016>.
- Maky MA, Ishibashi N, Zendo T, Honrada Perez R, Doud JR, Karmi M, Sonomoto K (2015) Identification and characterization of enterocin F4- 9, a novel O- linked 1 glycosylated bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*; doi: 10.1128/AEM.00940-15.
- Mandal V, Kumar Sen S, Mandal NC (2011) Isolation and characterization of pediocin NV 5 producing *Pediococcus acidilactici* LAB 5 from vacuum- packed fermented meat product. *Indian Journal of Microbiology* 51 (1): 22- 29.
- Mantovani HC, Cruz AOM, Paiva AD (2011) Bacteriocin activity and resistance in livestock pathogens. *Science Against Microbial Pathogens: communicating current research and technological advances* 2: 853- 863.
- Mariam SH, Zegeye N, Tariku T, Andargie E, Endalafer N, Aseffa A (2014) Potential of cell-free supernatants from cultures of selected lactic acid bacteria and yeast obtained from local fermented foods as inhibitors of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. *BMC Research Notes*; doi: 10.1186/1756-0500-7-606.
- Martinussen J, Solem C, Holm AK, Jensen PR (2013) Engineering strategies aimed at control of acidification rate of lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 24: 124- 129.
- Mathur H, Fallico V, O'Connor PM, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP (2017) Insights into the mode of action of the sacitibiotic thuricin CD. *Frontiers in microbiology*; doi: 10.3389/fmicb.2017.00696.

- Mathur H, Rea MC, Cotter PD, Hill C y Ross RP (2015) The sactibiotic subclass of bacteriocins: an update. *Current Protein and Peptide Science*; doi: 10.2174/1389203716666150515124831.
- Meybodi NM, Mortazavian AM (2017) Probiotic supplements and food products: a comparative approach. *Biochemistry and Pharmacology: Open Access*; doi: 10.4172/2167-0501.1000227.
- Mokoena MP (2017) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A Mini- Review. *Molecules* 22 (8): 1255; doi: 10.3390/molecules22081255.
- Murtaza MA, Shahid M, Hafiz I, Mueen- ud- Din G (2012) Characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Conference on Ecological, Environmental and Biological Sciences (ICEEBS'2012)* 7- 8 de Enero, 2012, Dubai.
- Namoco RA (2016) Linear programming approach for feed ration formulation of pre- starter swine using locally available feed ingredients in the Philippines. *Indian Journal of Science and Technology*; doi: 10.17485/ijst/2016/v9i48/106120.
- Noohi N, Ebrahimipour G, Rohani M, Talebi M, Pourshafie MR (2016) Evaluation of potential probiotic characteristics and antibacterial effects of strains of *Pediococcus* species isolated from broiler chickens. *British Poultry Science*; doi: 10.1080/00071668.2016.1169247.
- O'Bryan CA, Koo OK, Sostrin ML, Ricke SC, Crandall PG, Johnson MG (2018) Characteristics of bacteriocins and use as food antimicrobials in the United States. En: Ricke SC, Atungulu GG, Rainwater C, Park SH (Eds.) *Food and Feed Safety Systems and Analysis* (pp. 273- 286). Londres, Inglaterra: Elsevier Inc.
- Ohba T, Uemura K, Nabetani H (2016) Moderate pulsed electric field treatment enhances exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. *Process Biochemistry* 51 (9): 1120-1128.
- Okoro CI, Ihenetu FC, Ogwunga CC, Dunga KE (2017) Study on the antibacterial properties of probiotic bacteria isolated from human breast milk. *Journal of Scientific Research and Studies* 4 (10): 264- 268.
- Oppedijk SF, Martin NI, Breukink E (2015) Hit 'em where it hurts the growing and structurally diverse family of peptides that target lipid- II. *Biochimica et Biophysica Acta*; doi: 10.1016/j.bbamem.2015.10.024.

- Özogul F, Hamed I (2017) The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; doi: 10.1080/10408398.2016.1277972.
- Pan L, Zhao PF, Ma XK, Shang QH, Xu YT, Long SF, Wu Y, Yuan FM, Piao XS (2017) Probiotic supplementation protects weaned pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 challenge and improves performance similar to antibiotics. *Journal of Animal Science* 95 (6): 2627- 2639.
- Papadimitriou K, Alegría A, Bron PA, de Angelis M, Gobbetti M, Kleerebezem M, Lemos JA, Linares DM, Ross P, Stanton C, Turrone F, van Sinderen D, Varmanen P, Ventura M, Zúñiga M, Tsakalidou E, Kok J (2016) Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80 (3): 837- 890.
- Parra Huertas RA (2010). Review Lactic Acid Bacteria: Functional role in the foods. *Revista Bioagro* 8 (1): 93- 105.
- Pascual L, Barberis L (2011) Prevention strategy of urogenital infections by using Lactobacilli with probiotic properties. En: Peter Tenke (Ed.) *Urinary tract infections*; doi: 10.5772/24716.
- Pascual L, Daniele MB, Giordano W, Barberis L (2008a) Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology* 56 (4): 397- 402.
- Pascual L, Daniele MB, Ruiz F, Giordano W, Pájaro C, Barberis L (2008b) *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *The Journal of General and Applied Microbiology* 54 (3): 141- 8.
- Patel R, DuPont HL (2015) New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics and synbiotics. *Clinical Infectious Diseases* 60 (2): 108- 121.
- Pattanayaiying R, H- Kittikun A, Cutter CN (2014) Effect of lauric arginate, nisin Z and a combination against several food- related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*; doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.013.
- Peng C, Borges S, Magalhães R, Carvalheira A, Ferreira V, Casquete R, Teixeira P (2017) Characterization of anti- listerial bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods from Cambodia. *International Food Research Journal* 24 (1): 386- 393.
- Pérez Guerra N, Fajardo Bernárdez P, Méndez J, Cachaldora P, Pastrana Castro L (2007) Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as

- feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*; doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.05.010.
- Pilasombut K, Rumjuankiat K, Ngamyeesoon N, Duy LND (2015) *In vitro* characterization of bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from nem chua, a traditional vietnamese fermented pork. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 35 (4): 473- 478.
- Pohl CH, Kock JLF, Thibane VS (2011) Antifungal free fatty acids: a review. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* 3: 61- 71.
- Porcellato D, Tranvåg M, Narvhus J (2016) Short communication: presence of *Lactococcus* and lactococcal exopolysaccharide operons on the leaves of *Pinguicula vulgaris* supports the traditional source of bacteria present in scandinavian ropy fermented milk. *Journal of Dairy Science* 99 (9): 7049- 7052.
- Porto MCW, Kuniyoshi TM, Oliveira de Souza de Azevedo P, Vitolo M, Pinheiro de Souza Oliveira P (2017) *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Journal Biotechnology Advances Research Reviews*; doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.03.004.
- Pujato SA, Mercanti DJ, Guglielmotti DM, Rousseau GM, Moineau S, Reinheimer JA, Quiberoni AL (2015) Phages of dairy *Leuconostoc mesenteroides*: genomics and factors influencing their adsorption. *International Journal of Food Microbiology*; doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.016.
- Rajoka MSR, Shi J, Zhu J, Shao D, Huang Q, Yang H, Jin M (2016) Capacity of lactic acid bacteria in immunity enhancement and cancer prevention. *Applied Microbiology and Biotechnology*; doi: 10.1007/s00253-016-8005-7.
- Reis JA, Paula AT, Casarotti SN, Penna ALB (2012) Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*; doi: 10.1007/s12393-012-9051-2.
- Ríos Colombo NS, Chalón MC, Navarro SA, Bellomio A (2017) Pediocin-like bacteriocins: new perspectives on mechanism of action and immunity. *Current Genetics*; doi: 10.1007/s00294-017-0757-9.
- Ruíz FO, Pascual L, Giordano W, Barberis L (2015) Bacteriocins and other bioactive substances of probiotic lactobacilli as biological weapons against *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Pathogens and Disease*; doi: 10.1093/femspd/ftv013.

- Sahraoui Y, Fayolle K, Leriche F, Flèche- Matéos AL, Sadoun D (2015) Antibacterial and technological properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KJ660075 strain selected for its inhibitory power against *Staphylococcus aureus* for cheese quality improving. *Journal of Food Science and Technology*; doi: 10.1007/s13197-015-1845-9.
- Sánchez A, Vázquez A (2017) Bioactive peptides: a review. *Food Quality and Safety*; doi: <https://doi.org/10.1093/fqs/fyx006>.
- Sauer M, Russmayer H, Grabherr R, Peterbauer CK, Marx H (2017) The efficient clade: lactic acid bacteria for industrial chemical production. *Trends in Biotechnology*; doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.05.002>.
- Sharma AK, Kumar S, Harish K, Dhakan DB, Sharma VK (2016) Prediction of peptidoglycan hydrolases- a new class of antibacterial proteins. *BMC Genomics*; doi: 10.1186/s12864-016-2753-8.
- Sharma M, Raj Modi D, Saxena M (2014) Role of lactic acid bacteria as probiotics in health and disease. *Prensa Médica Argentina*; doi: <http://dx.doi.org/10.4172/lpma.1000147>
- Shewale RN, Sawale PD, Khedkar CD, Singh A (2014) Selection criteria for probiotics: a review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 9: 17- 22.
- Shi F, Wang Y, Li Y, Wang X (2016) Mode of action of leucocin K7 produced by *Leuconostoc mesenteroides* K7 against *Listeria monocytogenes* and its potential in milk preservation. *Biotechnology Letters*; doi: 10.1007/s10529-016-2127-y.
- Shokryazdan P, Boo Liang J, Sieo CC, Kalavathy R, Alitheen NB, Jahromi MF, Wan Ho Y (2014) Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed Research International*; doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/927268>
- Shokryazdan P, Jahromi MF, Boo Liang J, Wan Ho Y (2017) Probiotics: from isolation to application. *Journal of the American College of Nutrition*; doi: 10.1080/07315724.2017.1337529.
- Shukla R, Goyal A (2013) Probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* CRAG3: a new isolate from fermented cucumber. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*; doi: 10.1007/s12602-013-9149-8.
- Siddegowda GS, Bhaskar N, Gopal S (2017) Fermentative properties of proteolytic *Pediococcus* strains isolated from salt fermented fish hydrolysate prepared using

- freshwater fish rohu (*Labeo rohita*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*; doi: 10.1080/10498850.2016.1185754.
- Silva BC, Sandes SHC, Alvim LB, Bomfim MRQ, Nicoli JR, Neumann E, Nunes AC (2016) Selection of a candidate probiotic strain of *Pediococcus pentosaceus* from the faecal microbiota of horses by *in vitro* testing and health claims in a mouse model of *Salmonella* infection. *Journal of Applied Microbiology*; doi: 10.1111/jam.13339.
- Silva MS, Ramos CL, González- Avila M, Gschaedler A, Arrizon J, Schwan RF, Dias DR (2017) Probiotic properties of *Weissella cibaria* and *Leuconostoc citreum* isolated from tejuino- a typical mexican beverage. *Food Science and Technology* 86: 227-232.
- Song AA, In LLA, Lim SHE, Rahim RA (2017) A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial Cell Factories*; doi: 10.1186/s12934-017-0669-x.
- Stoyanova LG, Ustyugova EA, Netrusov AI (2011) Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology* 48 (3): 229- 243.
- Šušković J, Kos B, Beganović J, Leboš Pavunc A, Habjanic K, Matošić S (2010) Antimicrobial activity- the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology* 48 (3): 296- 307.
- Tahara T, Oshimura M, Umezawa C, Kanatani K (1996) Isolation, partial characterization, and mode of action of acidocin J1132, a two- component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3): 892- 897.
- Teodoro de Paula A, Jeronymo- Ceneviva AB, Faria Silva L, Todorov SD, Gombossy de Melo Franco BD, Choiset Y, Haertle T, Chobert JM, Dousset X, Barretto Penna AL (2014) *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a bacteriocinogenic strain isolated from brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*; doi: 10.1007/s12602-014-9163-5.
- Tripathi MK, Giri SK (2014) Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods* 9: 225- 241.
- Tulini FL, Winkelströter LK, De Martinis ECP (2013) Identification and evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian semi- hard artisanal cheese. *Anaerobe* 22: 57- 63.

- Vasiee A, Behbahani BA, Yazdi FT, Mortazavi SA, Noorbakhsh H (2017) Diversity and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from horreh, a traditional iranian fermented food. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*; doi: 10.1007/s12602-017-9282-x.
- Vidhyasagar V, Jeevaratnam K (2013) Bacteriocin activity against various pathogens produced by *Pediococcus pentosaceus* VJ13 isolated from Idly batter. *Biomedical Chromatography*; doi: 10.1002/bmc.2948.
- Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Heinz Schleifer K, Whitman WB (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume three. The Firmicutes*. New York, United States: Springer.
- Vyas TK, Desai P, Patel AR, Patel KG (2017) Exploration of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* from indian fermented food for curd preparation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6 (10): 3137- 3144.
- Wedajo B (2015) Lactic acid bacteria: benefits, selection criteria and probiotic potential in fermented food. *Journal of Probiotics and Health*; doi: <http://dx.doi.org/10.4172/2329-8901.1000129>.
- Wen LS, Philip K, Ajam N (2015) Purification, characterization and mode of action of Plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*; doi: 10.1016/j.foodcont.2015.08.010.
- Woraprayote W, Malila Y, Sorapukdee S, Swetwiwathana A, Benjakul S, Visessanguan W (2016) Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science* 120: 118- 132.
- Yadav R, Puniya AK, Shukla P (2016) Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an indigenous fermented beverage raabadi. *Frontiers in Microbiology*; doi: 10.3389/fmicb.2016.01683.
- Yang F, Hou C, Zeng X, Qiao S (2015) The use of lactic acid bacteria as a probiotic in swine diets. *Pathogens*; doi: 10.3390/pathogens4010034.
- Yi L, Dang J, Zhang L, Wu Y, Liu B, Lü X (2016) Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8. *Food Control*; doi: 10.1016/j.foodcont.2016.02.008.
- Zacharof MP, Lovitt RW (2012) Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia* 2: 50- 56.

Zhang T, Pan Y, Li B, Ou J, Zhang J, Chen Y, Peng X, Chen L (2012) Molecular cloning and antimicrobial activity of enterolysin A and helveticin J of bacteriolysins from metagenome of chinese traditional fermented foods. *Food Control* 31: 499- 507.

Zommiti M, Almohammed H, Ferchichi M (2016) Purification and characterization of a novel anti- *Campylobacter* bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* DN317. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*; doi: 10.1007/s12602-016-9237-7.

9. Anexo estadístico

9. ANEXO ESTADÍSTICO

Comparación entre los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de seis cepas de *S. aureus* producidos por bacterias ácido lácticas mediante la técnica de estrías cruzadas.

Halos de inhibición producidos por *L. mesenteroides* B19

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,20	0,00	10,40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,42	5	0,88	0,30	0,8945
Columnal	4,42	5	0,88	0,30	0,8945
Error	17,50	6	2,92		
Total	21,92	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,79688

Error: 2,9167 gl: 6

Columnal	Medias	n	E.E.
S. aureus 147	15,50	2	1,21 A
S. aureus 169	16,00	2	1,21 A
S. aureus 168	16,50	2	1,21 A
S. aureus 156	16,50	2	1,21 A
S. aureus 146	16,50	2	1,21 A
S. aureus 145	17,50	2	1,21 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por *P. acidilactici* B82

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,78	0,59	6,56

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	34,67	5	6,93	4,16	0,0560
Columnal	34,67	5	6,93	4,16	0,0560
Error	10,00	6	1,67		
Total	44,67	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,13796

Error: 1,6667 gl: 6

Columnal	Medias	n	E.E.
S. aureus 145	18,00	2	0,91 A
S. aureus 168	18,50	2	0,91 A
S. aureus 146	18,50	2	0,91 A
S. aureus 147	19,50	2	0,91 A
S. aureus 169	20,50	2	0,91 A
S. aureus 156	23,00	2	0,91 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por *P. acidilactici* B83

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,60	0,27	11,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	46,42	5	9,28	1,83	0,2420
Columna1	46,42	5	9,28	1,83	0,2420
Error	30,50	6	5,08		
Total	76,92	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,97306

Error: 5,0833 gl: 6

Columna1	Medias	n	E.E.
S. aureus 146	16,50	2	1,59 A
S. aureus 169	18,50	2	1,59 A
S. aureus 168	19,00	2	1,59 A
S. aureus 147	19,50	2	1,59 A
S. aureus 145	21,50	2	1,59 A
S. aureus 156	22,50	2	1,59 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por *P. pentosaceus* B86

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,75	0,54	10,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	84,42	5	16,88	3,62	0,0745
Columna1	84,42	5	16,88	3,62	0,0745
Error	28,00	6	4,67		
Total	112,42	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,59745

Error: 4,6667 gl: 6

Columna1	Medias	n	E.E.
S. aureus 146	16,50	2	1,53 A
S. aureus 169	20,50	2	1,53 A
S. aureus 168	21,50	2	1,53 A
S. aureus 145	22,50	2	1,53 A
S. aureus 147	24,00	2	1,53 A
S. aureus 156	24,50	2	1,53 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,61	0,28	13,54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	92,75	5	18,55	1,87	0,2338
Columnal	92,75	5	18,55	1,87	0,2338
Error	59,50	6	9,92		
Total	152,25	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=12,53283

Error: 9,9167 gl: 6

Columnal	Medias	n	E.E.
S. aureus 146	17,50	2	2,23 A
S. aureus 168	22,50	2	2,23 A
S. aureus 169	24,00	2	2,23 A
S. aureus 147	24,50	2	2,23 A
S. aureus 145	25,00	2	2,23 A
S. aureus 156	26,00	2	2,23 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación entre los diámetros promedio de los halos de inhibición del crecimiento producidos por bacterias ácido lácticas sobre *S. aureus* mediante la técnica de estrías cruzadas.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	30	0,54	0,47	11,40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	156,87	4	39,22	7,47	0,0004
Columnal	156,87	4	39,22	7,47	0,0004
Error	131,33	25	5,25		
Total	288,20	29			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,88635

Error: 5,2533 gl: 25

Columnal	Medias	n	E.E.
L. mesenteroides 19	16,42	6	0,94 A
P. acidilactici 83	19,58	6	0,94 A B
P. acidilactici 82	19,67	6	0,94 A B
P. pentosaceus 86	21,58	6	0,94 B
L. lactis 87	23,25	6	0,94 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación entre los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de dos cepas de *L. monocytogenes* producidos por bacterias ácido lácticas mediante la técnica de estrías cruzadas.

Halos de inhibición producidos por *L. mesenteroides* B19

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,17	0,00	7,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,00	1	1,00	0,40	0,5918
Columna1	1,00	1	1,00	0,40	0,5918
Error	5,00	2	2,50		
Total	6,00	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,79724

Error: 2,5000 gl: 2

	Columna1	Medias	n	E.E.
L.monocytogenes	22	19,50	2	1,12 A
L.monocytogenes	17	20,50	2	1,12 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por *P. acidilactici* B82

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,20	0,00	7,25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,00	1	1,00	0,50	0,5528
Columna1	1,00	1	1,00	0,50	0,5528
Error	4,00	2	2,00		
Total	5,00	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,07964

Error: 2,0000 gl: 2

	Columna1	Medias	n	E.E.
L.monocytogenes	22	19,00	2	1,00 A
L.monocytogenes	17	20,00	2	1,00 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por *P. acidilactici* B83

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,17	0,00	7,53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,00	1	1,00	0,40	0,5918
Columna1	1,00	1	1,00	0,40	0,5918
Error	5,00	2	2,50		
Total	6,00	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,79724

Error: 2,5000 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
L.monocytogenes	17	20,50	2 1,12 A
L.monocytogenes	22	21,50	2 1,12 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por *P. pentosaceus* B86

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,44	0,17	7,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,00	1	4,00	1,60	0,3333
Columna1	4,00	1	4,00	1,60	0,3333
Error	5,00	2	2,50		
Total	9,00	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,79724

Error: 2,5000 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
L.monocytogenes	22	20,50	2 1,12 A
L.monocytogenes	17	22,50	2 1,12 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,05	0,00	14,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,00	1	1,00	0,10	0,7818
Columna1	1,00	1	1,00	0,10	0,7818
Error	20,00	2	10,00		
Total	21,00	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=13,59448

Error: 10,0000 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
L.monocytogenes	22	21,00	2 2,24 A
L.monocytogenes	17	22,00	2 2,24 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Comparación entre los diámetros promedio de los halos de inhibición del crecimiento producidos por bacterias ácido lácticas sobre *L. monocytogenes* mediante la técnica de estrías cruzadas.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	10	0,62	0,32	4,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,60	4	1,65	2,06	0,2236
Columnal	6,60	4	1,65	2,06	0,2236
Error	4,00	5	0,80		
Total	10,60	9			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,58800

Error: 0,8000 gl: 5

	Columnal	Medias	n	E.E.
P. acidilactici	82	19,50	2	0,63 A
L. mesenteroides	19	20,00	2	0,63 A
P. acidilactici	83	21,00	2	0,63 A
P. pentosaceus	86	21,50	2	0,63 A
L. lactis	87	21,50	2	0,63 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación entre los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de cinco cepas de *E. coli* producidos por bacterias ácido lácticas mediante la técnica de estrías cruzadas.

Halos de inhibición producidos por *L. mesenteroides* B19

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	10	0,14	0,00	7,33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,60	4	0,40	0,21	0,9218
Columnal	1,60	4	0,40	0,21	0,9218
Error	9,50	5	1,90		
Total	11,10	9			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,52948

Error: 1,9000 gl: 5

	Columnal	Medias	n	E.E.
E. coli LAMA 544	544	18,50	2	0,97 A
E. coli 202		18,50	2	0,97 A
E. coli 201		18,50	2	0,97 A
E. coli 200		19,00	2	0,97 A
E. coli LAMA 543	543	19,50	2	0,97 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por *P. acidilactici* B82

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	10	0,78	0,60	5,85

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	30,60	4	7,65	4,43	0,0669
Columna1	30,60	4	7,65	4,43	0,0669
Error	8,63	5	1,73		
Total	39,23	9			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,26868

Error: 1,7250 gl: 5

Columnal	Medias	n	E.E.
E. coli 200	19,50	2	0,93 A
E. coli 202	22,00	2	0,93 A
E. coli LAMA 543	22,50	2	0,93 A
E. coli 201	23,50	2	0,93 A
E. coli LAMA 544	24,75	2	0,93 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por *P. acidilactici* B83

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	10	0,73	0,52	5,38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15,00	4	3,75	3,41	0,1055
Columna1	15,00	4	3,75	3,41	0,1055
Error	5,50	5	1,10		
Total	20,50	9			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,20730

Error: 1,1000 gl: 5

Columnal	Medias	n	E.E.
E. coli 200	18,00	2	0,74 A
E. coli 201	18,50	2	0,74 A
E. coli 202	19,50	2	0,74 A
E. coli LAMA 543	20,00	2	0,74 A
E. coli LAMA 544	21,50	2	0,74 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por *P. pentosaceus* B86

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	10	0,60	0,28	10,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	29,00	4	7,25	1,86	0,2557
Columna1	29,00	4	7,25	1,86	0,2557
Error	19,50	5	3,90		
Total	48,50	9			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,92209

Error: 3,9000 gl: 5

Columna1	Medias	n	E.E.
E. coli 202	17,50	2	1,40 A
E. coli 200	18,50	2	1,40 A
E. coli 201	18,50	2	1,40 A
E. coli LAMA 544	21,00	2	1,40 A
E. coli LAMA 543	22,00	2	1,40 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	10	0,72	0,50	4,86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	14,40	4	3,60	3,27	0,1128
Columna1	14,40	4	3,60	3,27	0,1128
Error	5,50	5	1,10		
Total	19,90	9			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,20730

Error: 1,1000 gl: 5

Columna1	Medias	n	E.E.
E. coli LAMA 544	19,50	2	0,74 A
E. coli 201	21,50	2	0,74 A
E. coli 200	21,50	2	0,74 A
E. coli LAMA 543	22,50	2	0,74 A
E. coli 202	23,00	2	0,74 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación entre los diámetros promedio de los halos de inhibición del crecimiento producidos por bacterias ácido lácticas sobre *E. coli* mediante la técnica de estrías cruzadas.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	25	0,52	0,42	7,39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	49,09	4	12,27	5,42	0,0040
Columnal	49,09	4	12,27	5,42	0,0040
Error	45,30	20	2,27		
Total	94,39	24			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,84826

Error: 2,2650 gl: 20

	Columnal	Medias	n	E.E.
L. mesenteroides	19	18,80	5	0,67 A
P. acidilactici	83	19,50	5	0,67 A
P. pentosaceus	86	19,50	5	0,67 A
L. lactis	87	21,60	5	0,67 A B
P. acidilactici	82	22,45	5	0,67 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación entre los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de dos cepas de *Salmonella spp.* producidos por bacterias ácido lácticas mediante la técnica de estrías cruzadas.

Halos de inhibición producidos por *L. mesenteroides* B19

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,71	0,57	5,66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,25	1	6,25	5,00	0,1548
Columnal	6,25	1	6,25	5,00	0,1548
Error	2,50	2	1,25		
Total	8,75	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,80638

Error: 1,2500 gl: 2

	Columnal	Medias	n	E.E.
Salmonella sp.	234	18,50	2	0,79 A
Salmonella sp.	235	21,00	2	0,79 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por *P. acidilactici* B82

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,21	0,00	9,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,25	1	2,25	0,53	0,5425
Columna1	2,25	1	2,25	0,53	0,5425
Error	8,50	2	4,25		
Total	10,75	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,86252

Error: 4,2500 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
Salmonella sp. 234	20,50	2	1,46 A
Salmonella sp. 235	22,00	2	1,46 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por *P. acidilactici* B83

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,05	0,00	16,22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,00	1	1,00	0,10	0,7818
Columna1	1,00	1	1,00	0,10	0,7818
Error	20,00	2	10,00		
Total	21,00	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=13,59448

Error: 10,0000 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
Salmonella sp. 234	19,00	2	2,24 A
Salmonella sp. 235	20,00	2	2,24 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por *P. pentosaceus* B86

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,64	0,46	7,19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9,00	1	9,00	3,60	0,1982
Columna1	9,00	1	9,00	3,60	0,1982
Error	5,00	2	2,50		
Total	14,00	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,79724

Error: 2,5000 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
Salmonella sp. 234	20,50	2	1,12 A
Salmonella sp. 235	23,50	2	1,12 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,10	0,00	15,07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,25	1	2,25	0,22	0,6855
Columnal	2,25	1	2,25	0,22	0,6855
Error	20,50	2	10,25		
Total	22,75	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=13,76336

Error: 10,2500 gl: 2

	Columnal	Medias	n	E.E.
Salmonella sp. 234	20,50	2	2,26	A
Salmonella sp. 235	22,00	2	2,26	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación entre los diámetros promedio de los halos de inhibición del crecimiento producidos por bacterias ácido lácticas sobre *Salmonella* spp. mediante la técnica de estrías cruzadas.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	10	0,47	0,05	6,94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9,25	4	2,31	1,11	0,4427
Columnal	9,25	4	2,31	1,11	0,4427
Error	10,38	5	2,08		
Total	19,63	9			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,77852

Error: 2,0750 gl: 5

	Columnal	Medias	n	E.E.
P. acidilactici 83	19,50	2	1,02	A
L. mesenteroides 19	19,75	2	1,02	A
P. acidilactici 82	21,25	2	1,02	A
L. lactis 87	21,25	2	1,02	A
P. pentosaceus 86	22,00	2	1,02	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación entre los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de dos cepas de *Shigella* spp. producidos por bacterias ácido lácticas mediante la técnica de estrías cruzadas.

Halos de inhibición producidos por *L. mesenteroides* B19

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,80	0,70	3,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,00	1	4,00	8,00	0,1056
Columna1	4,00	1	4,00	8,00	0,1056
Error	1,00	2	0,50		
Total	5,00	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,03982

Error: 0,5000 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
Shigella sp. 206	19,50	2	0,50 A
Shigella sp. 205	21,50	2	0,50 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por *P. acidilactici* B82

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,03	0,00	7,43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,25	1	0,25	0,06	0,8310
Columna1	0,25	1	0,25	0,06	0,8310
Error	8,50	2	4,25		
Total	8,75	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,86252

Error: 4,2500 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
Shigella sp. 206	27,50	2	1,46 A
Shigella sp. 205	28,00	2	1,46 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por *P. acidilactici* B83

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,03	0,00	10,18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,25	1	0,25	0,06	0,8310
Columna1	0,25	1	0,25	0,06	0,8310
Error	8,50	2	4,25		
Total	8,75	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,86252

Error: 4,2500 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
Shigella sp. 206	20,00	2	1,46 A
Shigella sp. 205	20,50	2	1,46 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por *P. pentosaceus* B86

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,26	0,00	3,74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,56	1	0,56	0,69	0,4929
Columna1	0,56	1	0,56	0,69	0,4929
Error	1,63	2	0,81		
Total	2,19	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,87502

Error: 0,8125 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
Shigella sp. 206	23,75	2	0,64 A
Shigella sp. 205	24,50	2	0,64 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,15	0,00	4,93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,56	1	0,56	0,36	0,6094
Columna1	0,56	1	0,56	0,36	0,6094
Error	3,13	2	1,56		
Total	3,69	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,37369

Error: 1,5625 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
Shigella sp. 205	25,00	2	0,88 A
Shigella sp. 206	25,75	2	0,88 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Comparación entre los diámetros promedio de los halos de inhibición del crecimiento producidos por bacterias ácido lácticas sobre *Shigella* spp. mediante la técnica de estrías cruzadas.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	10	0,97	0,94	3,18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	82,96	4	20,74	36,87	0,0007
Columna1	82,96	4	20,74	36,87	0,0007
Error	2,81	5	0,56		
Total	85,78	9			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,00863

Error: 0,5625 gl: 5

Columna1	Medias	n	E.E.
P. acidilactici 83	20,25	2	0,53 A
L. mesenteroides 19	20,50	2	0,53 A
P. pentosaceus 86	24,13	2	0,53 B
L. lactis 87	25,38	2	0,53 B C
P. acidilactici 82	27,75	2	0,53 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Comparación entre los diámetros promedio de los halos de inhibición del crecimiento de cepas de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. producidos por bacterias ácido lácticas mediante la técnica de estrías cruzadas.

Halos de inhibición producidos por *L. mesenteroides* B19

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	17	0,83	0,77	4,61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	41,98	4	10,50	14,59	0,0001
Columna1	41,98	4	10,50	14,59	0,0001
Error	8,63	12	0,72		
Total	50,62	16			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,33616

Error: 0,7194 gl: 12

Columnal	Medias	n	E.E.
<i>S. aureus</i>	16,42	6	0,35 A
<i>E. coli</i>	18,80	5	0,38 B
<i>Salmonella</i> sp.	19,75	2	0,60 B
<i>L.monocytogenes</i>	20,00	2	0,60 B
<i>Shigella</i> sp.	20,50	2	0,60 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por *P. acidilactici* B82

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	17	0,76	0,68	7,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	110,75	4	27,69	9,66	0,0010
Columna1	110,75	4	27,69	9,66	0,0010
Error	34,38	12	2,87		
Total	145,13	16			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,66217

Error: 2,8653 gl: 12

Columnal	Medias	n	E.E.
<i>L.monocytogenes</i>	19,50	2	1,20 A
<i>S. aureus</i>	19,67	6	0,69 A
<i>Salmonella</i> sp.	21,25	2	1,20 A
<i>E. coli</i>	22,45	5	0,76 A
<i>Shigella</i> sp.	27,75	2	1,20 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por *P. acidilactici* B83

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	17	0,12	0,00	8,23

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,20	4	1,05	0,40	0,8081
Columna1	4,20	4	1,05	0,40	0,8081
Error	31,83	12	2,65		
Total	36,03	16			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,48595

Error: 2,6528 gl: 12

Columnal	Medias	n	E.E.
E. coli	19,50	5	0,73 A
Salmonella sp.	19,50	2	1,15 A
S. aureus	19,58	6	0,66 A
Shigella sp.	20,25	2	1,15 A
L.monocytogenes	21,00	2	1,15 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por *P. pentosaceus* B86

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	17	0,35	0,13	10,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	33,70	4	8,43	1,59	0,2394
Columna1	33,70	4	8,43	1,59	0,2394
Error	63,49	12	5,29		
Total	97,19	16			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,33527

Error: 5,2908 gl: 12

Columnal	Medias	n	E.E.
E. coli	19,50	5	1,03 A
L.monocytogenes	21,50	2	1,63 A
S. aureus	21,58	6	0,94 A
Salmonella sp.	22,00	2	1,63 A
Shigella sp.	24,13	2	1,63 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	17	0,34	0,12	9,53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	28,99	4	7,25	1,57	0,2456
Columna1	28,99	4	7,25	1,57	0,2456
Error	55,48	12	4,62		
Total	84,47	16			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,92225

Error: 4,6234 gl: 12

Columnal	Medias	n	E.E.
Salmonella sp.	21,25	2	1,52 A
L.monocytogenes	21,50	2	1,52 A
E. coli	21,60	5	0,96 A
S. aureus	23,25	6	0,88 A
Shigella sp.	25,38	2	1,52 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación entre la inhibición producida por sobrenadantes libres de células puros (SLC) y neutralizados (SLCN) de bacterias ácido lácticas sobre cepas de *E. coli* mediante la técnica de difusión en pozos.

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *L. mesenteroides* B19 sobre *E. coli* 201

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,71	0,57	7,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	16,00	1	16,00	4,92	0,1567
Columna1	16,00	1	16,00	4,92	0,1567
Error	6,50	2	3,25		
Total	22,50	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,75005

Error: 3,2500 gl: 2

Columnal	Medias	n	E.E.
SLCN	23,00	2	1,27 A
SLC	27,00	2	1,27 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *L. mesenteroides* B19 sobre *E. coli* LAMA 543

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,94	0,90	6,95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	72,25	1	72,25	28,90	0,0329
Columna1	72,25	1	72,25	28,90	0,0329
Error	5,00	2	2,50		
Total	77,25	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,79724

Error: 2,5000 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
SLCN	18,50	2	1,12 A
SLC	27,00	2	1,12 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *L. mesenteroides* B19 sobre *E. coli* LAMA 544

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,86	0,80	5,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	16,00	1	16,00	12,80	0,0700
Columna1	16,00	1	16,00	12,80	0,0700
Error	2,50	2	1,25		
Total	18,50	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,80638

Error: 1,2500 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
SLCN	20,00	2	0,79 A
SLC	24,00	2	0,79 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *P. acidilactici* B82 sobre *E. coli* 201

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,38	0,07	6,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,00	1	4,00	1,23	0,3828
Columna1	4,00	1	4,00	1,23	0,3828
Error	6,50	2	3,25		
Total	10,50	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,75005

Error: 3,2500 gl: 2

Columnal Medias n E.E.

SLCN 26,00 2 1,27 A

SLC 28,00 2 1,27 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *P. acidilactici* B82 sobre *E. coli* LAMA 543

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,86	0,80	8,60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	64,00	1	64,00	12,80	0,0700
Columna1	64,00	1	64,00	12,80	0,0700
Error	10,00	2	5,00		
Total	74,00	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=9,61275

Error: 5,0000 gl: 2

Columnal Medias n E.E.

SLCN 22,00 2 1,58 A

SLC 30,00 2 1,58 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *P. acidilactici* B82 sobre *E. coli* LAMA 544

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,71	0,57	6,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	16,00	1	16,00	4,92	0,1567
Columna1	16,00	1	16,00	4,92	0,1567
Error	6,50	2	3,25		
Total	22,50	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,75005

Error: 3,2500 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
SLCN	25,00	2	1,27 A
SLC	29,00	2	1,27 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *L. lactis* B87 sobre *E. coli* 201

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,38	0,07	6,93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,00	1	4,00	1,23	0,3828
Columna1	4,00	1	4,00	1,23	0,3828
Error	6,50	2	3,25		
Total	10,50	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,75005

Error: 3,2500 gl: 2

Columna1	Medias	n	E.E.
SLCN	25,00	2	1,27 A
SLC	27,00	2	1,27 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *L. lactis* B87 sobre *E. coli* LAMA
543

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,62	0,42	4,14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,00	1	4,00	3,20	0,2155
Columnal	4,00	1	4,00	3,20	0,2155
Error	2,50	2	1,25		
Total	6,50	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,80638

Error: 1,2500 gl: 2

Columnal Medias	n	E.E.
SLCN	26,00	2 0,79 A
SLC	28,00	2 0,79 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *L. lactis* B87 sobre *E. coli* LAMA
544

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,38	0,07	7,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,00	1	4,00	1,23	0,3828
Columnal	4,00	1	4,00	1,23	0,3828
Error	6,50	2	3,25		
Total	10,50	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,75005

Error: 3,2500 gl: 2

Columnal Medias	n	E.E.
SLCN	24,00	2 1,27 A
SLC	26,00	2 1,27 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación entre los diámetros promedio de los halos de inhibición producidos por los sobrenadantes libres de células puros (SLC) y neutralizados (SLCN) de bacterias ácido lácticas sobre todas las cepas de *E. coli* mediante la técnica de difusión en pozos.

Halos promedio producidos por los SLC y SLCN de *L. mesenteroides* B19

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	6	0,73	0,67	8,74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	45,38	1	45,38	11,00	0,0295
Columnal	45,38	1	45,38	11,00	0,0295
Error	16,50	4	4,13		
Total	61,88	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,60423

Error: 4,1250 gl: 4

Columnal Medias n E.E.

SLCN	20,50	3	1,17	A
SLC	26,00	3	1,17	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos promedio producidos por los SLC y SLCN de *P. acidilactici* B82

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	6	0,75	0,69	6,12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	32,67	1	32,67	12,25	0,0249
Columnal	32,67	1	32,67	12,25	0,0249
Error	10,67	4	2,67		
Total	43,33	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,70194

Error: 2,6667 gl: 4

Columnal Medias n E.E.

SLCN	24,33	3	0,94	A
SLC	29,00	3	0,94	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos promedio producidos por los SLC y SLCN de *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	6	0,60	0,50	3,85

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,00	1	6,00	6,00	0,0705
Columnal	6,00	1	6,00	6,00	0,0705
Error	4,00	4	1,00		
Total	10,00	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,26697

Error: 1,0000 gl: 4

Columnal Medias n E.E.

SLCN	25,00	3	0,58	A
SLC	27,00	3	0,58	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Comparación entre la inhibición producida por sobrenadantes libres de células puros (SLC) y neutralizados (SLCN) de bacterias ácido lácticas sobre cepas de *S. aureus* mediante la técnica de difusión en pozos.

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *L. mesenteroides* B19 sobre *S. aureus* 156

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,96	0,94	6,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	64,00	1	64,00	51,20	0,0190
Columna1	64,00	1	64,00	51,20	0,0190
Error	2,50	2	1,25		
Total	66,50	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,80638

Error: 1,2500 gl: 2

Columnal	Medias	n	E.E.
SLCN	14,00	2	0,79 A
SLC	22,00	2	0,79 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *L. mesenteroides* B19 sobre *S. aureus* 169

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,90	0,85	6,15

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	36,00	1	36,00	18,00	0,0513
Columna1	36,00	1	36,00	18,00	0,0513
Error	4,00	2	2,00		
Total	40,00	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,07964

Error: 2,0000 gl: 2

Columnal	Medias	n	E.E.
SLCN	20,00	2	1,00 A
SLC	26,00	2	1,00 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *P. acidilactici* B82 sobre *S. aureus*
156

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,71	0,57	8,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	16,00	1	16,00	4,92	0,1567
Columna1	16,00	1	16,00	4,92	0,1567
Error	6,50	2	3,25		
Total	22,50	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,75005

Error: 3,2500 gl: 2

Columnal Medias n E.E.

SLCN 19,00 2 1,27 A

SLC 23,00 2 1,27 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *P. acidilactici* B82 sobre *S. aureus*
169

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,91	0,86	4,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	25,00	1	25,00	20,00	0,0465
Columna1	25,00	1	25,00	20,00	0,0465
Error	2,50	2	1,25		
Total	27,50	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,80638

Error: 1,2500 gl: 2

Columnal Medias n E.E.

SLCN 21,00 2 0,79 A

SLC 26,00 2 0,79 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *L. lactis* B87 sobre *S. aureus* 156

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,86	0,79	7,25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	25,00	1	25,00	12,50	0,0715
Columna1	25,00	1	25,00	12,50	0,0715
Error	4,00	2	2,00		
Total	29,00	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,07964

Error: 2,0000 gl: 2

Columnal Medias n E.E.

SLCN	17,00	2	1,00	A
SLC	22,00	2	1,00	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por los SLC y SLCN de *L. lactis* B87 sobre *S. aureus* 169

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,51	0,27	8,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9,00	1	9,00	2,12	0,2829
Columna1	9,00	1	9,00	2,12	0,2829
Error	8,50	2	4,25		
Total	17,50	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,86252

Error: 4,2500 gl: 2

Columnal Medias n E.E.

SLCN	22,00	2	1,46	A
SLC	25,00	2	1,46	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Comparación entre los diámetros promedio de los halos de inhibición producidos por los sobrenadantes libres de células puros (SLC) y neutralizados (SLCN) de bacterias ácido lácticas sobre todas las cepas de *S. aureus* mediante la técnica de difusión en pozos.

Halos promedio producidos por los SLC y SLCN de *L. mesenteroides* B19

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,65	0,48	17,59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	49,00	1	49,00	3,77	0,1917
Columnal	49,00	1	49,00	3,77	0,1917
Error	26,00	2	13,00		
Total	75,00	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=15,50009

Error: 13,0000 gl: 2

Columnal Medias n E.E.

SLCN 17,00 2 2,55 A

SLC 24,00 2 2,55 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos promedio producidos por los SLC y SLCN de *P. acidilactici* B82

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,76	0,64	8,10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20,25	1	20,25	6,23	0,1299
Columnal	20,25	1	20,25	6,23	0,1299
Error	6,50	2	3,25		
Total	26,75	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,75005

Error: 3,2500 gl: 2

Columnal Medias n E.E.

SLCN 20,00 2 1,27 A

SLC 24,50 2 1,27 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos promedio producidos por los SLC y SLCN de *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	4	0,48	0,23	13,56

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	16,00	1	16,00	1,88	0,3037
Columnal	16,00	1	16,00	1,88	0,3037
Error	17,00	2	8,50		
Total	33,00	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=12,53349

Error: 8,5000 gl: 2

Columnal Medias n E.E.

SLCN 19,50 2 2,06 A

SLC 23,50 2 2,06 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Comparación entre la inhibición producida por los sobrenadantes libres de células puros y neutralizados de *L. mesenteroides* B19, *P. acidilactici* B82 y *L. lactis* B87 sobre cepas de *E. coli*

Comparación entre la inhibición producida por los sobrenadantes libres de células puros de *L. mesenteroides* B19, *P. acidilactici* B82 y *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	18	0,38	0,30	6,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	28,00	2	14,00	4,62	0,0274
Columna1	28,00	2	14,00	4,62	0,0274
Error	45,50	15	3,03		
Total	73,50	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,61186

Error: 3,0333 gl: 15

Columnal Medias n E.E.

SLC B19	26,00	6	0,71	A
SLC B87	27,00	6	0,71	A B
SLC B82	29,00	6	0,71	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación entre la inhibición producida por los sobrenadantes libres de células neutralizados de *L. mesenteroides* B19, *P. acidilactici* B82 y *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	18	0,51	0,44	9,24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	70,78	2	35,39	7,66	0,0051
Columna1	70,78	2	35,39	7,66	0,0051
Error	69,33	15	4,62		
Total	140,11	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,22415

Error: 4,6222 gl: 15

Columnal Medias n E.E.

SLCN B19	20,50	6	0,88	A
SLCN B82	24,33	6	0,88	B
SLCN B87	25,00	6	0,88	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación entre la inhibición producida por los sobrenadantes libres de células puros y neutralizados de *L. mesenteroides* B19, *P. acidilactici* B82 y *L. lactis* B87 sobre cepas de *S. aureus*

Comparación entre la inhibición producida por los sobrenadantes libres de células puros de *L. mesenteroides* B19, *P. acidilactici* B82 y *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,04	0,00	9,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,00	2	1,00	0,20	0,8240
Columna1	2,00	2	1,00	0,20	0,8240
Error	45,50	9	5,06		
Total	47,50	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,43901

Error: 5,0556 gl: 9

Columna1	Medias	n	E.E.
SLC B87	23,50	4	1,12 A
SLC B19	24,00	4	1,12 A
SLC B82	24,50	4	1,12 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación entre la inhibición producida por los sobrenadantes libres de células neutralizados de *L. mesenteroides* B19, *P. acidilactici* B82 y *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,20	0,03	15,98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20,67	2	10,33	1,14	0,3617
Columna1	20,67	2	10,33	1,14	0,3617
Error	81,50	9	9,06		
Total	102,17	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,94099

Error: 9,0556 gl: 9

Columna1	Medias	n	E.E.
SLCN B19	17,00	4	1,50 A
SLCN B87	19,50	4	1,50 A
SLCN B82	20,00	4	1,50 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación entre la inhibición del crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* producida por los sobrenadantes libres de células puros y neutralizados de *L. mesenteroides* B19, *P. acidilactici* B82 y *L. lactis* B87

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células puro de *L. mesenteroides* B19

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	10	0,19	0,09	8,93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9,60	1	9,60	1,90	0,2058
Columna1	9,60	1	9,60	1,90	0,2058
Error	40,50	8	5,06		
Total	50,10	9			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,34917

Error: 5,0625 gl: 8

Columna1	Medias	n	E.E.
<i>S. aureus</i>	24,00	4	1,13 A
<i>E. coli</i>	26,00	6	0,92 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células neutralizado de *L. mesenteroides* B19

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	10	0,31	0,23	14,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	29,40	1	29,40	3,62	0,0936
Columna1	29,40	1	29,40	3,62	0,0936
Error	65,00	8	8,13		
Total	94,40	9			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,24293

Error: 8,1250 gl: 8

Columna1	Medias	n	E.E.
<i>S. aureus</i>	17,00	4	1,43 A
<i>E. coli</i>	20,50	6	1,16 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células puro de *P. acidilactici* B82

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	10	0,67	0,63	6,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	48,60	1	48,60	16,20	0,0038
Columna1	48,60	1	48,60	16,20	0,0038
Error	24,00	8	3,00		
Total	72,60	9			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,57819

Error: 3,0000 gl: 8

Columnal	Medias	n	E.E.
S. aureus	24,50	4	0,87 A
E. coli	29,00	6	0,71 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células neutralizado de *P. acidilactici* B82

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	10	0,52	0,46	10,18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	45,07	1	45,07	8,52	0,0193
Columna1	45,07	1	45,07	8,52	0,0193
Error	42,33	8	5,29		
Total	87,40	9			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,42413

Error: 5,2917 gl: 8

Columnal	Medias	n	E.E.
S. aureus	20,00	4	1,15 A
E. coli	24,33	6	0,94 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células puro de *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	10	0,53	0,47	7,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	29,40	1	29,40	8,88	0,0176
Columna1	29,40	1	29,40	8,88	0,0176
Error	26,50	8	3,31		
Total	55,90	9			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,70915

Error: 3,3125 gl: 8

Columnal	Medias	n	E.E.
S. aureus	23,50	4	0,91 A
E. coli	27,00	6	0,74 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células neutralizado de *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	10	0,63	0,58	10,23

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	72,60	1	72,60	13,35	0,0065
Columna1	72,60	1	72,60	13,35	0,0065
Error	43,50	8	5,44		
Total	116,10	9			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,47100

Error: 5,4375 gl: 8

Columnal	Medias	n	E.E.
S. aureus	19,50	4	1,17 A
E. coli	25,00	6	0,95 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Comparación entre los diámetros promedio de los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* LAMA 543, producidos por los sobrenadantes libres de células neutralizados de *L. mesenteroides* B19, *P. acidilactici* B82 y *L. lactis* B87 luego de recibir tratamiento con enzimas proteolíticas

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células neutralizado y tratado con enzimas proteolíticas de *L. mesenteroides* B19

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	1,00	1,00	12,50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	576,00	3	192,00	768,00	<0,0001
Columna1	576,00	3	192,00	768,00	<0,0001
Error	2,00	8	0,25		
Total	578,00	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,30735

Error: 0,2500 gl: 8

Columna1	Medias	n	E.E.
Sin diluir	0,00	3	0,29 A
Dilución ½	0,00	3	0,29 A
Dilución ¼	0,00	3	0,29 A
Control	16,00	3	0,29 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células neutralizado y tratado con enzimas proteolíticas de *P. acidilactici* B82

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,99	0,99	20,48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	930,25	3	310,08	286,23	<0,0001
Columna1	930,25	3	310,08	286,23	<0,0001
Error	8,67	8	1,08		
Total	938,92	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,72148

Error: 1,0833 gl: 8

Columna1	Medias	n	E.E.
Sin diluir	0,00	3	0,60 A
Dilución ½	0,00	3	0,60 A
Dilución ¼	0,00	3	0,60 A
Control	20,33	3	0,60 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células neutralizado y tratado con enzimas proteolíticas de *L. lactis* B87

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	12	0,99	0,99	21,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	462,25	3	154,08	264,14	<0,0001
Columna1	462,25	3	154,08	264,14	<0,0001
Error	4,67	8	0,58		
Total	466,92	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,99702

Error: 0,5833 gl: 8

Columna1	Medias	n	E.E.
Sin diluir	0,00	3	0,44 A
Dilución ¼	0,00	3	0,44 A
Dilución ¼	0,00	3	0,44 A
Control	14,33	3	0,44 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Comparación entre los diámetros promedio de los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* LAMA 543, producidos por los sobrenadantes libres de células de *L. mesenteroides* B19, *P. acidilactici* B82 y *L. lactis* B87 sometidos a diferentes tratamientos térmicos

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células de *L. mesenteroides* B19 tratado a diferentes temperaturas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	6	0,70	0,50	7,41

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	28,00	2	14,00	3,50	0,1643
Columna1	28,00	2	14,00	3,50	0,1643
Error	12,00	3	4,00		
Total	40,00	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,35753

Error: 4,0000 gl: 3

Columna1	Medias	n	E.E.
121°C	25,00	2	1,41 A
100°C	26,00	2	1,41 A
Control	30,00	2	1,41 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células de *P. acidilactici* B82 tratado a diferentes temperaturas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	6	0,34	0,00	7,38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,33	2	2,67	0,76	0,5400
Columnal	5,33	2	2,67	0,76	0,5400
Error	10,50	3	3,50		
Total	15,83	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,81775

Error: 3,5000 gl: 3

Columnal Medias	n	E.E.
100°C	24,00	2 1,32 A
Control	26,00	2 1,32 A
121°C	26,00	2 1,32 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células de *L. lactis* B87 tratado a diferentes temperaturas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	6	0,34	0,00	6,38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,33	2	2,67	0,76	0,5400
Columnal	5,33	2	2,67	0,76	0,5400
Error	10,50	3	3,50		
Total	15,83	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,81775

Error: 3,5000 gl: 3

Columnal Medias	n	E.E.
121°C	28,00	2 1,32 A
100°C	30,00	2 1,32 A
Control	30,00	2 1,32 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Comparación entre los diámetros promedio de los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* LAMA 543, producidos por los sobrenadantes libres de células de *L. mesenteroides* B19, *P. acidilactici* B82 y *L. lactis* B87 sometidos a diferentes valores de pH durante 5 horas.

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células de *L. mesenteroides* B19 tratado a diferentes valores de pH durante 5 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	14	0,93	0,87	5,34

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	134,43	6	22,40	14,94	0,0011
Columna1	134,43	6	22,40	14,94	0,0011
Error	10,50	7	1,50		
Total	144,93	13			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,85470

Error: 1,5000 gl: 7

Columna1	Medias	n	E.E.	
pH 11	16,50	2	0,87	A
pH 9	21,50	2	0,87	B
pH 2	22,50	2	0,87	B C
pH 7	23,00	2	0,87	B C
Control	25,00	2	0,87	B C
pH 4	25,50	2	0,87	B C
pH 5	26,50	2	0,87	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células de *P. acidilactici* B82 tratado a diferentes valores de pH durante 5 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	14	0,93	0,87	6,15

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	129,43	6	21,57	15,89	0,0009
Columna1	129,43	6	21,57	15,89	0,0009
Error	9,50	7	1,36		
Total	138,93	13			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,61774

Error: 1,3571 gl: 7

Columna1	Medias	n	E.E.	
pH 11	14,50	2	0,82	A
pH 9	15,50	2	0,82	A B
pH 2	17,00	2	0,82	A B C
pH 7	20,00	2	0,82	B C D
pH 4	20,50	2	0,82	C D
pH 5	22,00	2	0,82	D
Control	23,00	2	0,82	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células de *L. lactis* B87 tratado a diferentes valores de pH durante 5 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	14	0,94	0,89	7,59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	239,86	6	39,98	18,66	0,0006
Columna1	239,86	6	39,98	18,66	0,0006
Error	15,00	7	2,14		
Total	254,86	13			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,80247

Error: 2,1429 gl: 7

Columna1	Medias	n	E.E.
pH 11	12,00	2	1,04 A
pH 9	14,50	2	1,04 A B
pH 7	19,00	2	1,04 B C
pH 4	21,00	2	1,04 C
pH 2	21,50	2	1,04 C
Control	23,00	2	1,04 C
pH 5	24,00	2	1,04 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación entre los diámetros promedio de los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* LAMA 543, producidos por los sobrenadantes libres de células de *L. mesenteroides* B19, *P. acidilactici* B82 y *L. lactis* B87 sometidos a diferentes valores de pH durante 15 horas.

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células de *L. mesenteroides* B19 tratado a diferentes valores de pH durante 15 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	14	0,83	0,69	7,97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	66,43	6	11,07	5,74	0,0185
Columna1	66,43	6	11,07	5,74	0,0185
Error	13,50	7	1,93		
Total	79,93	13			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,50471

Error: 1,9286 gl: 7

Columna1	Medias	n	E.E.
pH 9	15,00	2	0,98 A
pH 11	15,50	2	0,98 A B
pH 7	16,00	2	0,98 A B
pH 2	16,00	2	0,98 A B
Control	19,00	2	0,98 A B
pH 5	19,50	2	0,98 A B
pH 4	21,00	2	0,98 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células de *P. acidilactici* B82 tratado a diferentes valores de pH durante 15 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	14	0,98	0,97	7,50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	631,43	6	105,24	73,67	<0,0001
Columna1	631,43	6	105,24	73,67	<0,0001
Error	10,00	7	1,43		
Total	641,43	13			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,73770

Error: 1,4286 gl: 7

Columna1	Medias	n	E.E.	
pH 11	0,00	2	0,85	A
pH 9	15,50	2	0,85	B
pH 7	17,00	2	0,85	B C
pH 2	18,50	2	0,85	B C
pH 5	20,00	2	0,85	B C
pH 4	20,00	2	0,85	B C
Control	20,50	2	0,85	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células de *L. lactis* B87 tratado a diferentes valores de pH durante 15 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	14	0,98	0,97	8,16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	618,86	6	103,14	62,78	<0,0001
Columna1	618,86	6	103,14	62,78	<0,0001
Error	11,50	7	1,64		
Total	630,36	13			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,08062

Error: 1,6429 gl: 7

Columna1	Medias	n	E.E.	
pH 11	0,00	2	0,91	A
pH 9	14,50	2	0,91	B
pH 7	17,50	2	0,91	B C
pH 2	19,00	2	0,91	B C
pH 5	19,50	2	0,91	B C
pH 4	19,50	2	0,91	B C
Control	20,00	2	0,91	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Comparación entre los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* LAMA 543, producidos por los sobrenadantes libres de células neutralizados de *L. mesenteroides* B19, *P. acidilactici* B82 y *L. lactis* B87 sometidos a tratamiento con urea al 1% y sin tratar

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células neutralizado de *L. mesenteroides* B19 tratado con urea al 1% y sin tratar

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	6	0,63	0,53	5,14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13,50	1	13,50	6,75	0,0602
Columna1	13,50	1	13,50	6,75	0,0602
Error	8,00	4	2,00		
Total	21,50	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,20598

Error: 2,0000 gl: 4

Columnal Medias n E.E.

Urea 1% 26,00 3 0,82 A

Control 29,00 3 0,82 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células neutralizado de *P. acidilactici* B82 tratado con urea al 1% y sin tratar

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	6	0,59	0,49	5,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10,67	1	10,67	5,82	0,0734
Columna1	10,67	1	10,67	5,82	0,0734
Error	7,33	4	1,83		
Total	18,00	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,06949

Error: 1,8333 gl: 4

Columnal Medias n E.E.

Urea 1% 25,67 3 0,78 A

Control 28,33 3 0,78 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición producidos por el sobrenadante libre de células neutralizado de *L. lactis* B87 tratado con urea al 1% y sin tratar

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	6	0,39	0,24	5,59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,00	1	6,00	2,57	0,1841
Columna1	6,00	1	6,00	2,57	0,1841
Error	9,33	4	2,33		
Total	15,33	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,46285

Error: 2,3333 gl: 4

Columna1 Medias n E.E.

Urea 1% 26,33 3 0,88 A

Control 28,33 3 0,88 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)