



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS TABASCO

MAESTRÍA TECNOLÓGICA EN PRODUCTOS LÁCTEOS

**SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
AISLADAS DEL QUESO DE PORO ARTESANAL
DE BALANCÁN, TABASCO.**

MARGARITA MADRIGAL MENDOZA

TESINA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA TECNOLÓGICA

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2016

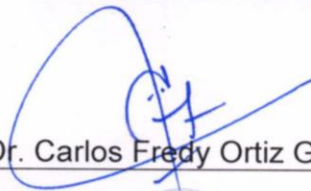
La presente tesina, titulada "**Susceptibilidad de antibióticos de bacterias ácido lácticas aisladas de Queso de Poro artesanal de Balancán Tabasco**", realizada por la alumna: Margarita Madrigal Mendoza, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRÍA TECNOLÓGICA
EN PRODUCTOS LÁCTEOS**


CONSEJO PARTICULAR



CONSEJERO: _____
Dr. Adolfo Bucio Galindo



ASESOR: _____
Dr. Carlos Fredy Ortiz García



ASESOR: _____
Dr. Román Jiménez Vera

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO A 28 DE SEPTIEMBRE DEL 2016

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO A 28 DE SEPTIEMBRE DEL 2016

RESUMEN

SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL QUESO DE PORO ARTESANAL DE BALANCÁN, TABASCO.

Margarita Madrigal Mendoza, MT

Colegio de Postgraduados, 2016

La ausencia de genes transferibles de resistencia a antibióticos está considerada como una característica importante para la selección de cepas de interés industrial. Entre ellas las bacterias ácido lácticas (BAL) que se emplean principalmente como cultivos iniciadores para la elaboración de productos lácteos. El queso de poro es un producto regional elaborado con leche entera de vaca sin pasteurizar en la subregión Ríos, en Tabasco, México. El objetivo de este estudio fue evaluar la susceptibilidad a los antibióticos en BAL aisladas de quesos de poro artesanal elaborado en Balancán, Tabasco. Se realizó el aislamiento e identificación preliminar de las BAL inoculando en caldo MRS e incubando por 24 horas a 37 °C; se sembró por duplicado en agar lactobacilos MRS, incubado en anaerobiosis a 37°C por 48 horas. Se obtuvieron 30 cepas puras con las características de las BAL, posteriormente se evaluó su susceptibilidad con 12 diferentes antibióticos utilizando la técnica de difusión en agar, obteniendo mediante la lectura de los halos de inhibición (en mm) del crecimiento como variable de respuesta. Finalmente se calculó el índice de resistencia múltiple a antibióticos (MAR). Se obtuvo un alto índice de multiresistencia (89.7%), incluso cepas resistentes a todos los antibióticos evaluados (24.1%) probablemente relacionadas con el uso indiscriminado de antibióticos en el hato ganadero para controlar infecciones y mejorar el crecimiento o por la resistencia intrínseca que bacterias lácticas presentan. En general, los antibióticos a los que presentaron mayor resistencia las BAL fueron: Vancomicina (96.6%), sulfametoxazol-trimetoprim (73.33%), gentamicina (90%), dicloxacilina (53.33%) y tetraciclina (50%); sin embargo, presentan mayor sensibilidad a la eritromicina (75.9%), cefotaxima (69%) y penicilina (65.5%). La resistencia de las bacterias ácido lácticas posee dos aspectos: 1) son portadoras y potenciales transmisoras de información de resistencia a antibióticos, lo que constituye un peligro ya que se ingieren junto con los alimentos de manera muy frecuente y 2) la información de resistencia las hace apropiadas

para ingerirse después de un tratamiento con antibióticos, ya que pueden apoyar a regenerar la microbiota intestinal.

Palabras clave: susceptibilidad, queso de poro, bacterias ácido lácticas, antibióticos.

ABSTRACT

SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS FOR LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM ARTISANAL PORO CHEESE IN BALANCÁN TABASCO

Margarita Madrigal Mendoza, MT

Post graduate School, 2016

The absence of Transfer genes that are resistant to antibiotics is considered as an important characteristic for the selection of strains of industrial interest. Among them, the lactic acid bacteria (LAB) that are mainly used as a starter culture in the production of dairy products, are found. Poro cheese is a regional product made of whole cow's milk, milk that is unpasteurized in the subregion "Ríos" in Tabasco Mexico. The purpose of this study was to evaluate susceptibility to antibiotics in LAB isolated from artisanal "Poro" cheese that is made in Balancán Tabasco. Isolation and preliminary identificación of LAB were carried out by inoculating into MRS broth and incubating at 37 °C for 24 hours, I was cultivated in duplicate lactobacilli MRS agar, incubating in anaerobiosis at 37°C for 48 hours. 30 pure strains were obtained with the characteristics of LAB, after this, their susceptibility was evaluated by 12 different antibiotics using the agar diffusion test, obtaining through the interpretation of the inhibition halos (in mm) of growth as a response variable. Finally, the multiple antibiotic resistance Index. A high Index of multi resistance was obtained (89.7%), even strains that are resistant to all the antibiotics that were evaluated (24.1%) probably related to the discriminate usage of antibiotics in the cattle herd to control infections and improve growth or intrinsic resistance that lactic bacteria show. In general, antibiotics to which resistance had higher the BAL were: Vancomycin (96.6 %), trimethoprim-sulfamethoxazole (73.33 %), gentamicin (90 %), dicloxacillin (53.33 %) and tetracycline (50 %); however, are more sensitive to erythromycin (75.9 %), cefotaxime (69 %) and penicillin (65.5 %). Lactic acid bacteria resistance has 2 aspects: they are carriers and potential transmitters of information of resistance to antibiotics, which poses great danger since they are very frequently ingested with food and 2) the resistance information makes them appropriate to be ingested after treatment with antibiotics, because they can be helpful when regenerating intestinal microbiota.

Key words: susceptibility, "Poro" cheese, lactic acid bacteria, antibiotics.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño a mi padres, porque me dieron la vida y son mi apoyo incondicionalmente.

A mi esposo, por tu comprensión y apoyo insustituible en aquellos momentos en que el estudio y el trabajo ocuparon mi tiempo y esfuerzo. Mi triunfo es tuyo, ¡te amo!

A mis hijas Brisley Lisseth y Emma Elizabeth, quienes me prestaron el tiempo que le pertenecía, motivándome a superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor

AGRADECIMIENTOS

Primero dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente.

A la Sociedad Sociedad Productora de Queso de Poro Genuinos de Balancán S.P.R. de R.L. de C.V. por la beca otorgada para la realización de la Maestría.

Al Instituto Tecnológico Superior de los Ríos en especial al Ing. José Luis Sánchez Moreno por la oportunidad de superarme profesionalmente y el apoyo brindado siempre.

Al Colegio de Postgraduados por mis profesores que me brindaron los conocimientos necesarios para esta especialidad.

Un agradecimiento especial a mi Profesor consejero el Dr. Adolfo Bucio Galindo y al Dr. Carlos Fredy Ortiz García por brindar el seguimiento y apoyo necesario cuando lo requería.

Al Dr. Román Jiménez Vera por su colaboración, paciencia y apoyo brindado en la parte experimental del proyecto y sobre todo por la amistad que me brinda.

A mis compañeros de posgrado por su amistad.

A mis amigas Beatriz Domínguez Valenzuela, Elizabeth Ramírez Mosqueda y Marisol García Valenzuela por el apoyo y cariño que me brindan.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo general	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
2.3 Hipótesis.....	6
3. REVISIÓN DE LITERATURA	7
3.1 Queso de poro de Balancán.....	7
3.2 Bacterias ácido lácticas.....	10
3.2.1 Compuestos antimicrobianos producidos por BAL	11
3.3 Bacterias ácido lácticas en quesos	12
3.4 Antibióticos de uso clínico	13
3.5 Presencia de antibióticos en la leche	21
3.6 Resistencia a antibióticos	23
3.7 Mecanismos de resistencia antibiótica	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1 Área de estudio	29
4.2 Plan de muestreo	29
4.3 Identificación de bacterias ácido lácticas	30
4.4 Prueba de sensibilidad a antibióticos	31
4.5 Índice de resistencia múltiple a antibióticos.....	33
Antibiograma de las cepas puras aisladas del queso de poro, la prueba se realizó por duplicado.....	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36

5.1 Identificación de bacterias ácido lácticas	36
5.2 Prueba de sensibilidad a antibióticos	37
6. CONCLUSIONES	49
7. RECOMENDACIONES.....	50
8. LITERATURA CITADA	51
9. ANEXO	55
Anexo 1. Muestras analizadas y cepas obtenidas	55
Anexo 2. Tabla de interpretación de halos para cada antibiótico	56
Anexo 3. Antibiograma completo de las cepas de BAL aisladas del queso de poro.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición proximal y fisicoquímica del queso de poro	7
Tabla 2 Descriptores finales de queso de poro por categoría	9
Tabla 3 Microorganismos registrados en el queso de poro.	10
Tabla 4 Diseño de experimento.....	34
Tabla 5 Modo de acción y concentración de los antibióticos evaluados.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación de NAG-NAM glucósidos unidos por enlace β -1,4.	15
Figura 2. Mecanismos de resistencia a los antibióticos: inactivación del antibiótico por enzimas. Fuente: Apuntes de clases, 2016.	27
Figura 3 Mecanismos de resistencia a los antibióticos: inactivación del antibiótico por enzimas. Fuente: Apuntes de clases, 2016.	27
Figura 4 Localización del municipio de Balancán, Tabasco. Fuente: Manjarrez et al., 2007.	30
Figura 5 Antibióticos utilizados	31
Figura 6 Antibiograma de las bacterias ácido lácticas	32
Figura 7 Observación macroscópica de las bacterias ácido lácticas obtenidas	36
Figura 8 Identificación preliminar de las BAL mediante tinción de Gram, positiva para bacterias ácido lácticas (Tortora et al., 2007) y prueba de catalasa, negativa (Gamazo et al., 2005).....	37
Figura 9 Cepa que presenta resistencia múltiple a antibióticos.....	38
Figura 10. Cepa que presenta sensibilidad a antibióticos	38
Figura 11. Antibiograma de las cepas puras aisladas del queso de poro tradicional, la prueba se realizó por duplicado.....	39
Figura 12. Cepa L4-1-2 inhibida por tetraciclina	42
Figura 13. Cepa L1-3-4 resistente a tetraciclina a la concentración de 30 μ g	43

ABREVIATURAS

BAL Bacteria Ácido Láctica

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

OMS Organización Mundial de la Salud

µg Microgramos

ADN Ácido desoxirribonucleico

1. INTRODUCCIÓN

En la sociedad actual, con mayor expectativa de vida, muestra un interés creciente por la salud y por todos aquellos factores que puedan afectarla. De estos la alimentación y su repercusión sobre la salud suscitan la mayor preocupación. Esto ha generado la aparición del nuevo concepto alimento funcional (Taranto *et al.*, 2005). Entre los alimentos funcionales más ampliamente difundidos se encuentran los que contienen bacterias ácido lácticas, como son: el yogur, las leches fermentadas y los quesos madurados.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos que tienen diversas aplicaciones, siendo una de las principales la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales para obtener productos como el yogurt, quesos, encurtidos, embutidos, ensilados, etc. También son de gran utilidad en la biopreservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva (Ramírez *et al.*, 2011).

Las BAL son cocos o bacilos, Gram-positivos, no formador de esporas y con ausencia de catalasa, anaerobios facultativos o aerotolerantes que fermentan diversos hidratos de carbono principalmente a lactato y acetato. (Von Wright y Axelsson, 2011).

Varios aminoácidos, vitaminas y minerales son esenciales para el crecimiento (Walstra *et al.*, 2006). En consecuencia, son comúnmente asociados con ambientes nutritivos como los alimentos, el material en descomposición y las superficies de las mucosas del tracto gastrointestinal de animales (Hammes y Hertel, 2006). En el intestino grueso, junto con las bifidobacterias forman parte de la flora benéfica. Muchas especies de este género se han identificado como probióticas. Los probióticos son microorganismos vivos, que cuando llegan en cantidades suficientes al intestino en un estado activo, ejercen efectos positivos para la salud. En su mayoría incluyen bacterias productoras de ácido láctico que alcanzan el intestino sin alteraciones, y además sin proporcionar daño al huésped (Bolívar-González *et al.*, 2015).

Una manera de obtener las bacterias ácido lácticas es mediante su aislamiento de alimentos fermentados o productos lácteos. Se ha reportado el aislamiento de alimentos fermentados como el pulque (Cervantes-Contreras y Pedroza-Rodríguez, 2007), de quesos (Martín del Campo *et al.*, 2008; Amorocho, 2011) y del pastizal de una finca lechera (Alvarado-Rivas y Díaz-Rivero (2009). Algunas de estas cepas se han aislado de productos que son comercializados con propiedades probióticas (Amorocho, 2011).

En la industria de alimentos, las bacterias ácido lácticas se emplean principalmente como cultivos iniciadores para la elaboración de productos lácteos y bebidas alcohólicas donde producen cambios específicos en el aroma, sabor, textura, cuerpo, acidez, humedad, digestibilidad y aspectos de los mismos (Mora y García, 2007). La importancia de las bacterias ácido lácticas no se limita al orden económico, sino que se debe ante todo a sus propiedades, que contribuyen a preservar y mejorar la salud.

Los antibióticos son altamente eficaces en el tratamiento y erradicación de las enfermedades bacterianas, sin embargo su eficacia se ha visto mermada por la aparición de mecanismos de resistencia. La resistencia antimicrobiana (AMR) es la capacidad de microorganismos de crecer a pesar de la exposición a sustancias antimicrobianas aplicados para inhibir su crecimiento (APUA, 2016). Las bacterias pueden desarrollar resistencia de dos maneras: 1) por una mutación genética o 2) mediante la adquisición de resistencia por parte de otra bacteria. Algunas mutaciones permiten a las bacterias producir enzimas que inactivan a los antibióticos; mientras que otras impiden su entrada, y otros desarrollan mecanismos de bombeo que expulsan el antibiótico al exterior de la bacteria. Las bacterias pueden adquirir genes de resistencia a antibióticos de otras bacterias de varias maneras, por ejemplo: en la "conjugación", las bacterias pueden transferir genes que codifican resistencia a los antibióticos que se encuentra en plásmidos y transposones a otra bacteria.

Las BAL y bifidobacterias presentes en los productos fermentados y en el tracto gastrointestinal de hombres y animales podrían actuar como reservorios de genes de

resistencia que, en último término, podrían transmitirse a microorganismos patógenos, bien en la matriz de los alimentos o en el propio tracto gastrointestinal (Florez, 2007).

Por tanto, la presencia de genes de resistencia a antibióticos debería examinarse minuciosamente en cepas que vayan a ser utilizadas como cultivos iniciadores o como probióticos en un sistema alimentario (Mora y García, 2007). Hasta el momento, no se ha prestado atención al estudio de la susceptibilidad a antibióticos en el grupo de las BAL y bifidobacterias, no existiendo siquiera puntos de corte claros para la mayoría de los antibióticos y la mayoría de las especies (Florez, 2007).

Entre los principales criterios de selección de microorganismos probióticos utilizados en la industria de los alimentos se encuentra, la seguridad biológica, es decir, no deben causar infecciones de órganos o de sistemas en los individuos (Cabrera-Cao *et al.*, 2005), deben ser microorganismos inocuos para el ser humano y ser preferiblemente de procedencia intestinal, sin esta propiedad, no deberían ser utilizados en la alimentación humana, ni animal (Brizuela *et al.*, 2001).

De igual forma, no deben contener genes transmisibles que puedan codificar la resistencia a los antibióticos, ya que de ser así puede haber transferencia de resistencia hacia microorganismos patógenos, lo que podría dificultar el tratamiento terapéutico de las infecciones causadas por dichos microorganismos (Moreno-Villares, 2006; Mejía *et al.*, 2007)

Por lo tanto, la ausencia de genes transferibles de resistencia a antibióticos está considerada como una característica importante para la selección de cepas de interés industrial (Martín, 2005; Mesas *et al.*, 2006), aunque no siempre se toma en cuenta al momento de seleccionarlas. Sin embargo, como en el caso de cualquier bacteria, es posible que las bacterias ácido lácticas utilizadas como probióticos posean información transmisible de resistencia a los antimicrobianos (Moreno-Villares, 2006).

Existe evidencia sobre la transferencia horizontal de plásmidos entre especies de bacterias lácticas como *Enterococcus faecalis* (Martín, 2005; Mesas *et al.*, 2006), y bacterias comensales como *Bacteroides* mediante el proceso de conjugación (Bello y

Fernández, 2006). De igual manera, se ha reportado la adquisición de resistencia a antibióticos en especies comerciales de *Lactobacillus acidophilus* en estudios *in vitro* e *in vivo* (Matter *et al.*, 2008), así como en probióticos de origen humano como las del género *Bifidobacterium* (Charteris *et al.*, 1998). Esto demuestra que las cepas bacterianas probióticas son susceptibles de contaminación mediante transferencia de plásmidos de resistencia a antibióticos de otras especies.

En México, no existen normas específicas para la elaboración y comercialización de alimentos con bacterias lácticas o microorganismos probióticos, los productos lácteos adicionados con estos microorganismos sólo deben cumplir con las normas para grupos indicadores y composición bormatológica. Dichas normas sólo evalúan la calidad sanitaria del producto mediante indicadores bacterianos sin tomar en cuenta la información sobre genes de resistencia a antibióticos que pudiera tener el microorganismo probiótico empleado (Matter *et al.*, 2008).

De acuerdo a los requisitos de la FAO, para garantizar la inocuidad de una cepa probiótica debe ser identificada a nivel de género, especie y cepa; en el estudio *in vitro* se ha de analizar la actividad antimicrobiana frente a patógenos, resistencia a las condiciones gastrointestinales y adherencia a la mucosa intestinal y células epiteliales. Además, para garantizar la seguridad se recomiendan pruebas de resistencia a antibióticos, estudios epidemiológicos y de actividades metabólicas perjudiciales para la salud de quien los ingiere (Amarocho, 2011).

Debido a que la ingestión de bacterias ácido lácticas en productos fermentados se realiza de manera voluntaria, constante y en altas concentraciones (10^6 - 10^8 /g), es importante establecer su total inocuidad, ya que de lo contrario, su ingestión puede contribuir a aumentar la aparición de cepas patógenas resistentes a antibióticos de última generación.

El queso de poro es un producto artesanal que se elabora en la subregión Ríos en el estado de Tabasco, principalmente en los municipios de Balancán y Tenosique. Es un queso fresco, ligeramente maduro, de pasta blanda y prensada, elaborado con leche cruda de vaca entera (Alejo-Martínez *et al.*, 2015). Este queso es comercializado

en el sureste de México y se ha reportado como una fuente importante de bacterias ácido lácticas (Rodríguez Almeida, 2013).

En este trabajo se evaluará la susceptibilidad a los antibióticos de cepas de bacterias lácticas aisladas de quesos de poro elaborados en la subregión Ríos de Tabasco. Los resultados de este trabajo permitirán conocer la susceptibilidad a los antibióticos de las bacterias ácido lácticas, así como a contribuir al establecimiento de un nuevo criterio para la selección de microorganismos de importancia industrial con la finalidad de ofrecer cepas bacterianas inocuas en beneficio de la salud.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Evaluar la sensibilidad a los antibióticos de bacterias ácido lácticas aisladas de queso de poro artesanal elaborado en la subregión Ríos de Tabasco.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar bacterias ácido lácticas provenientes del queso de poro.
- Evaluar la sensibilidad a los antibióticos de las bacterias ácido lácticas aisladas de queso de poro.

2.3 Hipótesis

Las bacterias ácido lácticas contenidas en el queso de poro de elaboración artesanal de la Región de los Ríos son sensibles a los principales antibióticos empleados en terapia clínica.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Queso de poro de Balancán

El queso de poro es un producto regional que se elabora en la subregión Ríos del estado de Tabasco, principalmente en los municipios de Balancán y Tenosique. Es un queso fresco, ligeramente maduro, de pasta blanda y prensada, elaborado con leche entera y cruda de vaca. A menudo, experimenta una maduración involuntaria adicional durante el periodo de distribución y comercialización. Se presenta al mercado en piezas pequeñas, prismático-rectangulares planas, con un peso que oscila entre 150 y 1000 g. Las piezas vienen parafinadas y envueltas en papel celofán amarillo, bajo el cual luce su etiqueta (Cervantes *et al*; 2006).

Este queso presenta valores de pH cercanos a 4.0, concentración de cloruro de sodio de 3.96 a 4.27 %, actividad de agua entre 0.93 y 0.96 y acidez entre 0.54 y 0.87 (Pérez, 2012). Se conserva bien a temperatura ambiente, ya que las condiciones de la pasta previenen el crecimiento de bacterias. Es considerado un queso genuino ya que es elaborado con leche pura de vaca y un mínimo de aditivos permitidos por las normas vigentes. No incluye grasa vegetal ni derivados proteicos. Posee una raíz histórica de poco más de 60 años y es resultado del saber hacer tradicional (Queso de Poro Genuino de Balancán, 2009). En la Tabla 1 se muestra la composición proximal y fisicoquímica del queso de poro.

Tabla 1 Composición proximal y fisicoquímica del queso de poro

Composición	Promedio	Rangos
Humedad (%)	33.20	26.32-41.87
Sólidos (%)	66.80	58.13-73.68
Proteínas (%)	28.61	24.27-32.75
Grasa	31.70	21.00-38.00
Cenizas (%)	4.26	2.15-7.10
Sal (NaCl) (%)	3.20	1.83-4.79
Calcio (ppm)	1773.70	890.35-3176.82
pH	4.34	3.88-5.21
Aw	0.940	0.884-0.968

Fuente: Yescas y Santacruz, 2013.

La pasta de este queso se encuentra fuertemente desmineralizada debido al reposo de varias horas de la cuajada húmeda en el molde. Durante el proceso de desmineralización la acidez de la pasta aumenta, constituyéndose ésta en un factor para su conservación. Otra característica notable de la pasta es su friabilidad (se desmorona fácilmente) al perder humedad, cuando el queso ha madurado algunas semanas. En el queso es fresco, al cortarse o tajarse la pasta parece separarse en capas; a veces también luce pequeños hoyos. Lo primero es debido a la disposición a la cuajada en capas durante el moldeado, y lo segundo es el probable efecto de la actividad de la microflora gasógena (Cervantes *et al*; 2006).

De acuerdo con Cervantes *et al.*, (2006) la elaboración del queso de poro se inicia con la adición a la leche del suero ácido de la cuajada del día anterior. Posterior a la cuajada se realiza el cortado del gel en bloques y se permite un reposo de 2 a 4 h. El moldeado se efectúa disponiendo la cuajada en moldes de madera, prismático-rectangulares, ahí la cuajada se auto-prensa. Tras el moldeado se efectúan cuatro inversiones de los moldes, en un lapso de 2 a 4 h. Después de la última inversión, la cuajada permanece dentro de los moldes durante un tiempo prolongado, entre 15 y 20 h.

El proceso del queso de poro continúa con el prensado, el cual se lleva a cabo empleando prensas rústicas de madera resistente. En ellas, cada queso fresco queda sujeto a la pesa de concreto o metal durante otras 24 h. La maduración se realiza colocando las piezas de queso recién desmoldado, en un armario de madera, cerrado. El salado final del queso se realiza frotando cada pieza con sal fina, en sucesivas aplicaciones, durante 3 días. Después de cada frotado, las unidades se reintroducen en el armario de maduración.

Posteriormente se realiza el parafinado sumergiendo las piezas de queso, previamente lavadas y oreadas, en un baño de parafina blanca fundida. El objetivo es formar una barrera contra la deshidratación del producto y la invasión de mohos. Finalmente se realiza la envoltura, las piezas de queso parafinadas se envuelven en

papel celofán amarillo debajo del cual se coloca una etiqueta de identificación comercial.

En un estudio sensorial realizado por Fernández *et al.*, (2011) se obtuvieron los descriptores del queso de poro de distintos productores de la subregión Ríos. Se seleccionó y entrenó a un grupo de 12 jueces lo cual permitió generar descriptores en la percepción de apariencia, olor, sabor y textura. Adicionalmente se realizó un estudio de consumidores en el municipio de Balancán, Tabasco. Los quesos también mostraron diferencias respecto a su nivel de agrado. Los descriptores para el queso de poro se muestran en el Tabla 2.

Tabla 2 Descriptores finales de queso de poro por categoría

Apariencia	Olor	Sabor	Textura
Amarillo	Leche búlgara	Ácido	Dureza
Láminas	Mantequilla	Mantequilla	Cre moso
Hoyos	Suero	Leche	Suavidad
Húmedo	Ácido láctico	Rancio	Poroso
Blanco	Establo	Amargo	Masudo
Brillante	Jocoque	Dulce	Seco
Cre moso	Ácido butírico	Astringente	Flexible
Mantequilla	Emmental	Pungente	
	Camembert		

Fuente: Fernández et al., 2011.

En cuanto a la presencia de microorganismos en el queso de poro, Pérez (2012) ha reportado la presencia de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, coliformes, y *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, aunque existe la presencia de algunos microorganismos patógenos al tiempo cero, su número no aumenta conforme pasa el tiempo de almacenamiento, posiblemente como consecuencia de la limitante de los parámetros fisicoquímicos. La Tabla 3 muestra la concentración de microorganismos indicadores al tiempo cero y a siete días de almacenamiento.

Tabla 3 Microorganismos registrados en el queso de poro.

Bacteria	Tiempo cero (Log UFC/g)	Siete días (Log UFC/g)
<i>Salmonella</i> sp.	3.77	1.85
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.15	3.80
Coliformes	3.03	3.00
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.00	Ausente

Fuente: Pérez, 2012.

Acosta (2009) evaluó el comportamiento de la flora microbiana durante el proceso de maduración de siete días del queso de poro, con la finalidad de establecer parámetros de calidad microbiológica que permitan mejorar la producción de este tipo de quesos en la región. Se encontró que las bacterias lácticas y las levaduras fueron los grupos de mayor concentración durante el proceso de maduración de siete días, mientras que los grupos de coliformes y *Staphylococcus aureus* disminuyeron su concentración al final del periodo de maduración.

El queso de poro presenta una alta acidez en comparación con otros quesos frescos. La elevada concentración de bacterias lácticas, así como su alta acidez, hacen del queso de poro un producto regional en cuya conservación no se emplea refrigeración, aun en la región del trópico, donde se alcanzan altas temperaturas. El incremento de la acidez se explica por la acción de microorganismos ácido-lácticos que utilizan los nutrientes del queso para producir ácidos orgánicos, como acético y láctico. En los alimentos con alta acidez los microorganismos patógenos presentan pocas posibilidades de sobrevivir (Acosta, 2009).

3.2 Bacterias ácido lácticas

Fernández y Jay, (citado en Mora, *et al*; 2007) indican que las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) fueron descubiertas en 1857 por Louis Pasteur siendo profesor de química y decano de ciencias en la universidad de Lille en Francia mientras realizaba estudios tras la consulta de los vinicultores de la región, de por qué se les descomponía y acidificaba el vino. En pocas semanas descubrió que la sustancia que lo alteraba era el ácido láctico, producto de la fermentación láctica desencadenada por ciertos

microorganismos. El término “*Bacterium acidi lactici*” se debe a Weigmamn que lo propuso en 1889 al definir las como bacterias que forman leche ácida a partir del azúcar de la leche.

En la actualidad, el grupo de las BAL está conformado por cocos, cocobacilos o bacilos Gram positivos, generalmente inmóviles y no esporulados, catalasa y oxidasa negativas, obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares produciendo ácido láctico como producto principal o único de su metabolismo, carecen de sistemas de transporte de electrones funcionales ligados al heme o de citocromos, y obtienen su energía por fosforilación a nivel del sustrato a la vez que oxidan carbohidratos; no tienen un ciclo de Krebs funcional (Mora, *et al*; 2007).

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

Prescott y col. (citado en Mora, *et al*; 2007) indica que la catalasa es una enzima que degrada el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), para realizar esta función necesita de un grupo porfirínico (citocromos), el cual las BAL son incapaces de sintetizar y, por tanto, este tipo de bacterias no posee dicha enzima, lo que permite la identificación del grupo como catalasa negativa. En ciertas condiciones, algunas bacterias son capaces de tomar grupos hemo externos para formar una enzima denominada pseudocatalasa. Una característica física debido a la ausencia de citocromos en las BAL es la formación de colonias color blanco lechoso.

3.2.1 Compuestos antimicrobianos producidos por BAL

Las BAL son conocidas por producir, durante su crecimiento, sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Esta característica se utiliza para la destrucción de bacterias indeseables o patógenas en la fabricación de los alimentos.

La mayor parte de estos compuestos no están caracterizados ni en cuanto a su naturaleza bioquímica ni en cuanto a su mecanismo de acción. Con frecuencia incluso, los productos activos no son más que metabolitos excretados por la bacteria como el ácido láctico o derivados del metabolismo del oxígeno como el H₂O₂ (Leveau y Bouix, 2000). En la actualidad se considera a las bacterias lácticas microorganismos GRAS por lo que su utilización y/o la de sus metabolitos como bioconservadores está recibiendo una gran atención (Gould, 1996; Stiles, 1996).

De hecho, existe la preocupación sobre la posible propagación de bacterias que presentan resistencia a antibióticos y son utilizadas en los productos probióticos.

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

3.3 Bacterias ácido lácticas en quesos

Los alimentos además de ser una fuente de nutrientes, a menudo constituyen un medio de cultivo ideal para la multiplicación microbiana. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos que tienen diversas aplicaciones, siendo una de las principales la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales para obtener productos como el yogurt, quesos, encurtidos, embutidos, ensilados, etc. Asimismo, las BAL son de gran utilidad en la producción de vinos y cerveza.

Las BAL, además de contribuir en la biopreservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva.

La leche es el medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL; por lo tanto, estos microorganismos son generalmente utilizados como cultivos iniciadores en la elaboración y conservación de productos lácteos, entre ellos el queso.

En las queserías las BAL se obtienen como material de una fermentación previa

(por ejemplo, suero de manufactura de quesos) usado para inocular un nuevo lote. Las principales funciones de las bacterias lácticas en los quesos son: la producción de ácido, la inhibición de microorganismos indeseables, la reducción de riesgos higiénicos, la coagulación de la leche, sinéresis del lactosuero, la reducción del contenido de azúcares, formación de aromas como los producidos por el diacetilo, la producción de gas requerida para la formación de hoyos en ciertos tipos de quesos y la proteólisis necesaria durante la maduración de los mismos. Además, las BAL disminuyen la lipólisis, lo cual evita la rancidez en los productos lácteos (Ramirez, 2011).

3.4 Antibióticos de uso clínico

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por microorganismos o que se sintetizan en el laboratorio para inhibir el desarrollo de otros microorganismos. Sus principales sitios de acción son 3: interfiriendo en la pared o membrana celular, interfiriendo síntesis de proteínas en los ribosomas (subunidades 30 S y 50s) e inhibiendo la síntesis de DNA.

Generalmente son descritos como bactericidas o bacteriostáticos, son activos contra las bacterias y pueden ser producidos sintéticamente en el laboratorio. Para que un antimicrobiano sea de utilidad debe reunir ciertas cualidades como: tener actividad antimicrobiana selectiva y eficaz; además, de ser de preferencia bactericida.

A continuación se describen los principales tipos de antibióticos, que son: aminoglucosidos, beta-lactanos, quinolonas, sulfonamidas, macrolidos, tetraciclinas, cefalosporinas y glicopeptidos.

3.4.1. Aminoglucósidos

Son sustancias producidas por *Streptomyces* spp. Su acción es de tipo bactericida y actúan en la subunidad 30S ribosomal. Su estructura química se compone de aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico

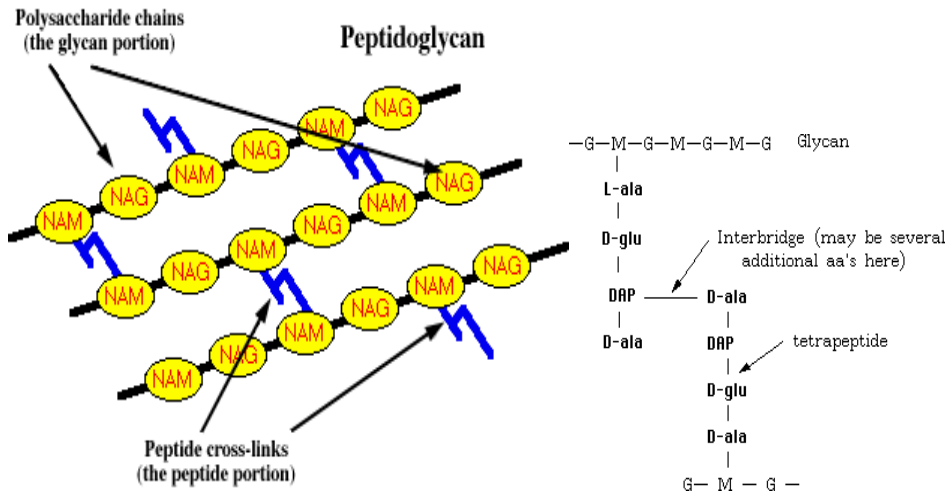
hexagonal con grupos amino (aminociclitol). Según que el componente aminociclitol sea la estreptidina o la desoxiestreptamina, se clasifican en dos grandes grupos. El primero está compuesto sólo por la estreptomina. El segundo es más amplio e incluye a la mayoría de los compuestos utilizados en la práctica clínica actual. Un compuesto peculiar es la espectinomicina, cuya estructura está compuesta solamente por aminociclitol sin componente aminoglucósido (Palomino y Pachón, 2003).

La acción de los aminoglucósidos comprende una interacción inicial con la superficie externa de la membrana celular bacteriana, transporte a través de la membrana interna y, finalmente, la unión a la subunidad 30S de los ribosomas, que inhibe la síntesis de proteínas, conduciendo finalmente a la muerte del microorganismo. Los mecanismos defensivos que desarrollan los microorganismos frente a los aminoglucósidos son de tres tipos: modificación enzimática de la molécula, alteración de la difusión y mutación ribosómica que origina menor afinidad por la subunidad 30S (demostrada en estreptomina). De todos ellos, la modificación enzimática es el mecanismo más frecuente (Palomino y Pachón, 2003).

Los plásmidos y los factores R (resistencia) diseminan el código genético de las enzimas que inactivan los aminoglucósidos (Acetiltransferasa, Adeniltransferasa y Fosfotransferasa) no sólo entre colonias de la misma especie, sino trans-especie, lo que ha representado uno de los principales hechos que aumenta la complejidad del control de la resistencia. Es así como muchos de los microorganismos inicialmente sensibles a estos medicamentos se vuelven resistentes. Sin embargo, existen estudios en los que se sugiere, con bases científicas confiables, que el uso conjunto de una penicilina con un aminoglucósido reduce la resistencia a ambos medicamentos (Rodríguez-Álvarez, 2002).

3.4.2. Betalactámicos

Son producidos por *Penicillium* spp. Su tipo de actividad es bactericida, su sitio de acción son las transpeptidasas. Inhiben el proceso de transpeptidación al unirse a la enzima transpeptidasa, e impide la polimerización de péptidos (líneas azules) que unen entre sí las cadenas de glicanos (Figura 1).



Símbolos: N-acetylglucosamine (NAG) y N-acetylmuramic acid (NAM).

Figura 1 Representación de NAG-NAM glucósidos unidos por enlace β -1,4.

Estos antibióticos inhiben la última etapa de síntesis de la pared celular bacteriana; interfieren en la síntesis de peptidoglicano mediante un bloqueo en la última etapa de su producción (transpeptidación). También actúan activando la autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Son compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico (Marín y Gudiol, 2003; Gómez *et al*; 2015).

Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos Gram negativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso y su eficacia en determinadas situaciones. Aun así, la Penicilina sigue siendo el tratamiento de elección en un buen número de infecciones clásicas como por ejemplo las infecciones respiratorias, sífilis, amigdalitis entre otras (Marín y Gudiol, 2003).

Son bactericidas parciales, ya que sólo actúan en fase de crecimiento celular y su eficacia es tiempo dependiente, ya que su efecto bactericida máximo ocurre a

concentraciones del antibiótico libre 4 a 5 veces por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI), por lo que es muy importante respetar o acortar los intervalos entre las dosis, especialmente en las infecciones graves por bacilos gramnegativos resistentes, dado que no tienen efecto post-antibiótico frente a éstos, mientras que sí lo muestran (de cerca de 2 horas) frente a cocos grampositivos (Gómez *et al*; 2015).

3.4.3 Quinolonas

Tiene origen sintético, es bactericida y actúa inhibiendo la DNA girasa. Su espectro se ha ido ampliando, sobre todo desde la introducción de un átomo de flúor en la posición 6 (fluoroquinolonas). Se usan en una gran variedad de infecciones como tratamiento de elección o alternativo, tanto a nivel hospitalario como extrahospitalario. Según el compuesto se emplean en infecciones del tracto urinario, enfermedades de transmisión sexual, osteomielitis crónica, infecciones del tracto respiratorio e infecciones sistémicas graves, entre otras. El surgimiento y extensión de resistencia a quinolonas ha limitado su uso en algunos casos y puede condicionarlo en el futuro en otros. Son bien toleradas y seguras. Los efectos adversos más frecuentes se observan a nivel gastrointestinal y del sistema nervioso central (Alós, 2003).

Por su amplio espectro son de elección para iniciar un tratamiento empírico, sin embargo, a pesar de su eficacia, no siempre constituyen el antibiótico de primera elección, ya que inducen resistencia de los microorganismos a las quinolonas, lo que da lugar a una pérdida de su utilidad clínica. El número de bacterias resistentes a las quinolonas ha ido aumentando, lo que se relaciona con el extenso uso. La resistencia de las bacterias a la acción de las quinolonas se desarrolla por la mutación del gen que codifica la síntesis de la cadena polipeptídica que forman las subunidades A de la DNA-girasa, lo que impide la unión de la quinolona a esta enzima (Campos *et al*; 2008).

En bacterias gramnegativas se han descrito resistencias de bajo nivel por alteraciones en las porinas que hay en la membrana externa. Recientemente se ha constatado que la sobreexpresión de bombas de expulsión activa puede llevar a resistencia a quinolonas tanto en grampositivos como en gramnegativos. La

resistencia transferible mediada por plásmidos sólo se ha confirmado en un número pequeño de cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Alós, 2003)

3.4.4 Sulfonamidas

Tiene origen sintético, es bacteriostático y actúa inhibiendo la pterinato sintetasa. Las sulfonamidas son antimicrobianos de amplio espectro, capaces de inhibir la producción de ácido fólico, necesario para la síntesis de ADN, impidiendo la reproducción de las células bacterianas. La analogía entre la estructura de las sulfonamidas y del ácido para-aminobenzoico (PABA), necesario para la síntesis del ácido fólico bacteriano, hace que actúen como antagonistas competitivos, debido a que se unen a la enzima tetrahidropterico sintetasa necesaria para la condensación del ácido fólico.

De este modo, las sulfonamidas impiden la incorporación de PABA a la molécula de ácido fólico, dificultando su biosíntesis, esencial para el crecimiento y la multiplicación bacteriana. Los microorganismos sensibles a las sulfonamidas son aquellos que deben sintetizar su propio ácido fólico, o son impermeables al ácido fólico circundante (Talero-Pérez *et al*; 2014).

Las sulfonamidas son fármacos usados ampliamente para el tratamiento de ciertas infecciones causadas por microorganismos gram-positivos y gram-negativos, algunos hongos, y ciertos protozoos. A pesar de la llegada de otros antibióticos, no ha disminuido la utilidad de las sulfonamidas, estos fármacos siguen ocupando un lugar importante en los recursos terapéuticos de los médicos y veterinarios (Delgado *et al*; 2014).

Aunque las sulfonamidas se han utilizado en medicina humana contra una amplia variedad de microbios, el uso actual es principalmente en el tratamiento de infecciones del tracto urinario. Este tipo de fármacos son ampliamente utilizados en piensos de animales de granja y en cultivos de peces como medicamentos para fines profilácticos y terapéuticos. Además, se sabe que el grupo de las sulfonamidas actúa como sustancias promotoras del crecimiento (Talero-Pérez *et al*; 2014)

La resistencia bacteriana a las sulfonamidas es muy frecuente, se presenta en 20 a 30 % de los casos y se desarrolla porque la bacteria sintetiza mayor cantidad de PABA o se logra una vía alterna para la síntesis de ácido fólico; también se ha propuesto que las enzimas bacterianas, la dihidropteroato sintetasa y la dihidrofolato reductasa sufren una mutación que disminuye la afinidad por sulfonamidas o trimetoprim, respectivamente. Hay evidencia de la formación de enzimas que metabolizan a las sulfonamidas o al trimetoprim. El desarrollo de resistencia ocurre por mutación cromosómica o por plásmides (factor R) con capacidad de transmitirse de una bacteria a otra (Patiño, 2008)

3.4.5 Macrólidos

Son producidos por *Actinomicetos*, bacteriostáticos y actúan inhibiendo la síntesis de proteína al unirse a la subunidad 50S ribosomal, descubiertos a mediados del siglo pasado, a partir del suelo de Filipinas. Se caracterizan por la presencia de un anillo lactónico con al menos uno de los azúcares de su estructura aminados. Se reconoce su amplio efecto antibiótico (generalmente bacteriostático, pudiendo ser bactericida a dosis altas) frente a bacterias grampositivas aeróbicas, anaeróbicas, gramnegativas y organismos atípicos como *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium avium* (Vega *et al*; 2005).

Estos antibióticos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas por unión a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano y bloquean el proceso de traslocación. El primer macrólido (Eritromicina) posee actividad antibacteriana sobre la mayor parte de cocos grampositivos y algunos anaerobios y bacilos grampositivos. Los bacilos gramnegativos son intrínsecamente resistentes a Eritromicina. Las características farmacocinéticas de los macrólidos, como volumen de distribución elevado y acumulación intracelular, permiten alcanzar concentraciones tisulares elevadas, que en las vías respiratorias son del orden de 50 a 100 veces superiores a las concentraciones plasmáticas (Sevilla-Sánchez *et al*; 2010).

La resistencia de los microorganismos frente a los macrólidos se produce por diferentes mecanismos. Algunos bacilos gramnegativos son resistentes por

incapacidad del medicamento para penetrar en los sitios receptores. En otras oportunidades, en microorganismos sensibles, la resistencia se produce por mutación o determinantes cromosómicos y otras veces es mediado por plásmidos.

Dentro de los diferentes mecanismos de resistencia a macrólidos, se puede mencionar: 1. La modificación del sitio blanco (metilación del ARNr, mutación del ARNr 23S y mutación de las r-proteínas 2. Síntesis de pequeños péptidos 3. Inactivación enzimática y, 4. Eflujo activo (Lucas *et al*; 2007).

3.4.6 Tetraciclinas

Son antibióticos derivados de las especies *Streptomyces* spp, son bacteriostáticos y su sitio de acción es la subunidad 30S del RNA ribosomal. Las tetraciclinas constituyen una familia de productos naturales (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina) y semisintéticos (metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina, tigeciclina, PTK 7906). Actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S de las bacterias. Son agentes básicamente bacteriostáticos, con actividad frente a una gran variedad de microorganismos, por lo que se convirtieron en antibióticos de uso habitual tanto en seres humanos como en animales, y también se utilizaron en algunas áreas de la agricultura (Vicente y Pérez-Trallero, 2010).

La selectividad de su acción depende de las diferencias en las características moleculares de los ribosomas bacterianos y las de los ribosomas de las células de mamíferos. Para que las tetraciclinas ejerzan su acción a nivel del ribosoma de las bacterias gramnegativas, se requiere que penetren a la célula del microorganismo por mecanismos de difusión pasiva a través de los canales hidrófilos (porinas) y por procesos de transporte activo dependiente de energía (Mendoza y Campos, 2008).

Estigmatizadas tiempo atrás por la frecuencia de microorganismos resistentes, actualmente han renacido al recuperar sensibilidad e incorporarse nuevos y más activos componentes. La doxiciclina es la tetraciclina más utilizada actualmente y constituye uno de los medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la

Salud. La tigeciclina, una tetraciclina de tercera generación, tiene un mayor espectro de actividad, y representa una alternativa en el tratamiento de infecciones complicadas con microorganismos multirresistentes (Vicente y Pérez-Trallero, 2010).

Las bacterias que desarrollan resistencia a una tetraciclina, habitualmente la presentan cruzada con otras. La resistencia es adquirida por plásmidos y es un rasgo inducible. Los tres mecanismos que dan lugar a este fenómeno son: 1) pérdida o disminución de la permeabilidad bacteriana para el antibiótico o la adquisición de una vía de salida dependiente de energía; 2) menor acceso de la tetraciclina al ribosoma bacteriano, y 3) formación de enzimas bacterianas que metabolizan al antibiótico (Mendoza y Campos, 2008).

3.4.7 Cefalosporinas

Son producidos por *Cephalosporium* spp, son bactericidas y actúan inhibiendo a la acción de la transpeptidasa, que sintetiza los aminos para la pared celular (ver esquema de los aminoglucosidos). Las Cefalosporinas son antibióticos muy parecidos a las penicilinas, sólo que estas tienen la ventaja sobre los primeros. Al igual que las penicilinas actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. En la actualidad siguen siendo una gran herramienta para el tratamiento de infecciones por gérmenes Gram positivos y Gram negativos, sobre todo si son productores de beta-lactamasas, ya que estos antibióticos han mostrado tener una buena resistencia a estas enzimas. A partir de ella se obtiene el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), que ha sido modificado con diferentes cadenas laterales, dando lugar a tres generaciones bien diferenciadas y a una cuarta que se está iniciando en la actualidad (Rivas *et al*; 2002).

Las cefalosporinas orales se han convertido en uno de los grupos de antimicrobianos empleados con mayor frecuencia en la población pediátrica, debido a diversas características farmacológicas, como la menor incidencia de eventos adversos, la vida media prolongada, la cobertura antimicrobiana, y mayor erradicación bacteriana, entre otras (Arredondo *et al.*, 2012).

Las bacterias logran hacerse resistentes a las cefalosporinas por diferentes mecanismos, estos pueden deberse a la incapacidad del antibiótico para llegar al sitio donde ejerce su acción, o por cambios que sufren las proteínas de unión, las cuales son blanco de las cefalosporinas, y por lo tanto disminuye enormemente la afinidad del antibiótico a estas proteínas o no logran ligarse a estas. Si el antibiótico se une sólo con una enzima a la que inactiva, una mutación en dicha enzima puede llevar a la resistencia (Rivas *et al*; 2002).

3.4.8 Glicopeptidos

Los producen varios actinomicetos, son bactericidas, y su sitio de acción es Acyl-D-alanil-d-alanina. Los más conocidos son Vancomicina y avoparcina, que forma un enlace no covalente rígido en la D-ala-D-ala interfiriendo con el proceso de formación de los peptidoglicanos.

3.5 Presencia de antibióticos en la leche

El uso de antibióticos en medicina veterinaria, sin lugar a dudas ha sido una de las principales herramientas en el control y erradicación de enfermedades infecciosas de origen bacteriano en animales de abasto y compañía. Sin embargo, casi paralelamente con su introducción a fines de la Segunda Guerra Mundial, se comenzó a investigar en torno a los efectos adversos que pudieran provocar la presencia de estos fármacos en productos destinados a consumo humano, como son leche, carne y huevos (San Martín y Moraga, 1996 citado por Mora, *et al*; 2007).

La presencia de concentraciones de antibióticos en leche que son superiores a las permitidas por normas sanitarias recibe, en general, la denominación de residuos, concentraciones residuales o inhibidores. La mayor parte de las muestras de leche que contienen concentraciones residuales corresponden a vacas que han recibido tratamiento con antibióticos por distintas vías, tanto a nivel sistémico como local: intramamario o intrauterino (Zurich y San Martín, 1994 citado por Mora, *et al*; 2007).

A fines de la década de los 60's, la OMS y la FAO establecen normas con fines de información y orientación de los países miembros, respecto de las concentraciones de residuos permitidas en leche de antibióticos de uso frecuente en ganado lechero, listado que ha ido incrementando en número de acuerdo a la incorporación de nuevos agentes antibacterianos.

La producción de productos fermentados es la más afectada en la industria cuando en la leche recibida están presentes residuos de antibióticos, provocando grandes pérdidas en calidad y, por ende, económicas.

Las bacterias, por efecto de los antibióticos, presentan cambios morfológicos y pueden darse situaciones en que los cultivos iniciadores sean reemplazados por microorganismos indeseables, provocando la inutilización del producto porque se convierte en peligroso para su consumo (Magariños, 2000). No obstante lo anterior, subsiste la duda de si el consumo de antibióticos por el hombre, a través de alimentos contaminados, puede alcanzar niveles que determinen una toxicidad de tipo crónico, motivo más que suficiente para prohibir la presencia de éstos en los alimentos (Mora, *et al*; 2007).

Otro de los problemas que ocasiona en el ser humano el antibiótico presente en la leche, lo constituyen las reacciones de tipo alérgico que se producen luego de un periodo de sensibilización, en el cual se generan en el sistema retículo endotelial anticuerpos contra la droga administrada que actúa como antígeno.

Según Bartlett, (1990) pueden provocar los siguientes efectos en el consumidor:

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

3.6 Resistencia a antibióticos

La resistencia se genera cuando una fracción de la población microbiana sobrevive a la acción de algún antibiótico por alguna modificación genética (generalmente mutación) que se incorpora a las células a nivel de plásmido. Posteriormente esa célula se multiplica generando una transmisión vertical de genes de resistencia. Esos microbios con modificación genética pueden transferir su resistencia también de modo horizontal a otras bacterias del mismo u otros grupos taxonómicos por 3 mecanismos: conjugación, transformación o transducción. En el primero, los genes puede pasar a otra bacteria por conjugación, ya sea a través del plásmido o por transposición del plásmido al cromosoma; en el segundo mecanismo, en la transformación, la resistencia se adquiere del DNA que está en el ambiente; y en el tercer mecanismo, la transferencia de material genético se da a partir de bacteriófagos, que son virus que atacan a las bacterias.

Los antibióticos han jugado un papel muy importante en la lucha del ser humano en contra de gran parte de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, estos logros han sido cuestionados por la aparición y diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos. La resistencia se define como la capacidad que poseen o desarrollan las bacterias para evadir la acción de los antibióticos, mismos que originalmente les causaban la muerte o las inhibían al ser expuestas a estos. Desde un punto de vista práctico una bacteria es sensible a un antibiótico, cuando el antibiótico es eficaz frente a ella y podemos esperar la curación de la infección; por el contrario es resistente cuando su crecimiento sólo puede ser inhibido a concentraciones superiores a las que el fármaco puede-ser suministrado en el lugar de la infección (Daza, 1998).

En los últimos años, se ha producido en diversos países un aumento en el gasto y consumo de antibióticos. Debido a un incremento del desarrollo de resistencia bacteriana, tanto a nivel hospitalario como en la comunidad. En la práctica clínica es frecuente observar diversas formas de uso inapropiado de estos medicamentos (Pineda-Maldonado *et al.*, 2013).

La búsqueda de antibióticos es un proceso constante debido a la rápida respuesta de los microorganismos para generar resistencia, del intercambio de material genético. El uso masivo y constante de antibióticos, tanto en la práctica médica pública como en la privada y en la zootecnia, ha ocasionado esta crisis. La mayoría de los gérmenes resistentes a los antibióticos se adaptan a vivir en alimentos, utensilios y equipo en las industrias; en el aire acondicionado, cánulas y tubos en los hospitales, desarrollando variantes peligrosas en pacientes inmuno-debilitados (Canale-Guerrero *et al.*, 2011).

La resistencia bacteriana involucra la aparición de un cambio permanente en el material genético del microorganismo, que se transmite a sus descendientes, los que por este motivo resultan también insensibles al antimicrobiano en cuestión. Si bien, cualquier microorganismo puede desarrollar resistencia a los antimicrobianos, este fenómeno ha sido estudiado más ampliamente en las bacterias.

Las bacterias, por su tremenda capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de diana para un antibiótico (como la falta de pared en el *Mycoplasma* en relación con los betalactámicos). La resistencia adquirida es la realmente importante desde un punto de vista clínico: es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes (rifampicina, macrólidos), pero la resistencia transmisible es la más importante, estando mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra (Daza, 1998).

La creciente resistencia bacteriana a los antimicrobianos ha resultado ser un serio problema de salud pública, debido al uso indiscriminado de los antibióticos tanto en la consulta externa como en pacientes hospitalizados. Actualmente es una preocupación importante para médicos y encargados del cuidado de la salud.

Aunque la resistencia no es un fenómeno universal, se afirma que tarde o temprano las bacterias desarrollan resistencia a cualquier antimicrobiano; en realidad,

hay algunas excepciones a ésta afirmación siendo una de las más notables la ausencia de resistencia, hasta el momento, de *Treponema pallidum* a la Penicilina G.

La resistencia microbiana constituye un problema de grandes implicancias clínicas, pues obliga al desarrollo y utilización de nuevos agentes antimicrobianos, más costosos y muchas veces más tóxicos que los empleados habitualmente en el tratamiento de las infecciones. Además, ha obligado a abandonar y eliminar del arsenal terapéutico a muchas drogas que inicialmente fueron muy útiles.

Hay dos tipos de resistencia, la resistencia natural la cual la presentan las bacterias de una misma especie frente a un determinado antibiótico. En este caso, todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y así, pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico conforme sus congéneres sensibles son destruidos. La resistencia adquirida constituye un problema en la terapia clínica, es la resistencia que surge en una especie bacteriana que era sensible a un fármaco. La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones y por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias.

En el primer caso, la resistencia se trasmite de forma vertical de generación en generación. En el segundo, la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable, esto último no sólo permite la transmisión a su propia descendencia durante el proceso normal de división y multiplicación, sino también a otras especies bacterianas no relacionadas. Esta es la más importante desde el punto de vista epidemiológico. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos. El ingreso del material transferido puede realizarse a través de diferentes procesos como la conjugación, transducción, transformación y transposición. La conjugación es la transferencia de genes entre bacterias sexualmente diferentes, requiere del contacto de célula a célula a través de pilis sexuales. La resistencia así adquirida se extiende rápidamente por que cada célula

recién infectada se convierte en donante de resistencia. La transducción se realiza por medio de bacteriófagos, por lo que no es necesario el contacto celular directo. Una vez que el bacteriófago entra en la célula huésped, se reproduce y la subsiguiente ruptura de la célula huésped libera muchos bacteriófagos que contienen plásmidos que pueden infectar otras bacterias del mismo o distinto género. Los plásmidos son fragmentos de DNA, los cuales se pueden replicar independientemente del genoma de la bacteria huésped o reproducirse integrado al cromosoma bacteriano. La transformación se ha registrado en medios de cultivos y ocurre entre las bacterias homólogas. Al sobrevenir la lisis de una bacteria resistente, una porción con el DNA penetra la pared celular de una bacteria sensible y se combina con el DNA de esta.

La transposición permite el intercambio entre plásmidos o de un plásmido hacia un cromosoma o hacia un fago sin necesidad de homología entre donador y receptor. Los elementos así actuantes se denominan transposones y son capaces de decidir su propio sitio de inserción. Los transposones son segmentos de DNA que pueden pasar de una posición en un genoma a otra, posición en el mismo genoma, o hacia un lugar diferente.

3.7 Mecanismos de resistencia antibiótica

Los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos son tres: 1) inactivación del antibiótico por enzimas, 2) reducción en la acumulación del antibiótico al interior de la célula por varios mecanismos, impedir que entre y/o promover que salga y, 3) alteración por parte de la bacteria de su punto diana, impidiendo o dificultando la acción del antibiótico.

En el primero las beta lactamasas hidrolizan el anillo activo de las penicilinas, y cefalosporinas, quedando el antibiótico inhabilitado para unirse al sitio PBP e impedir la síntesis los oligopeptidos entre los peptidoglicanos durante la síntesis de la pared celular (Figura 2).

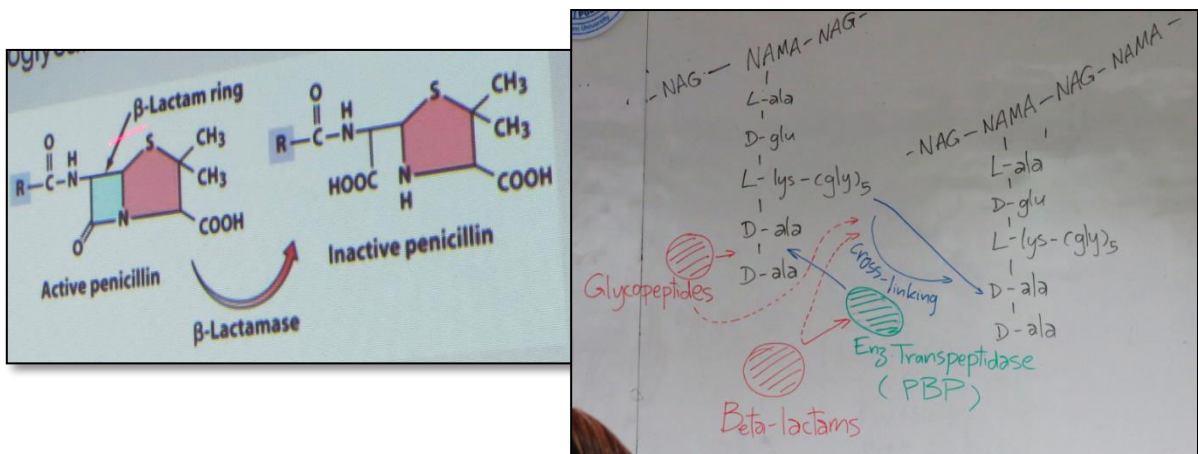


Figura 2. Mecanismos de resistencia a los antibióticos: inactivación del antibiótico por enzimas. Fuente: Apuntes de clases, 2016.

En el segundo, reducción en la acumulación intracelular del antibiótico (reducción de la permeabilidad de la membrana y pared celular) o aumento de mecanismos de transporte para la expulsión del antibiótico del citoplasma), y el tercero es protección, alteración o remplazo de los sitios que son atacados por los antibióticos (Figuras 3).

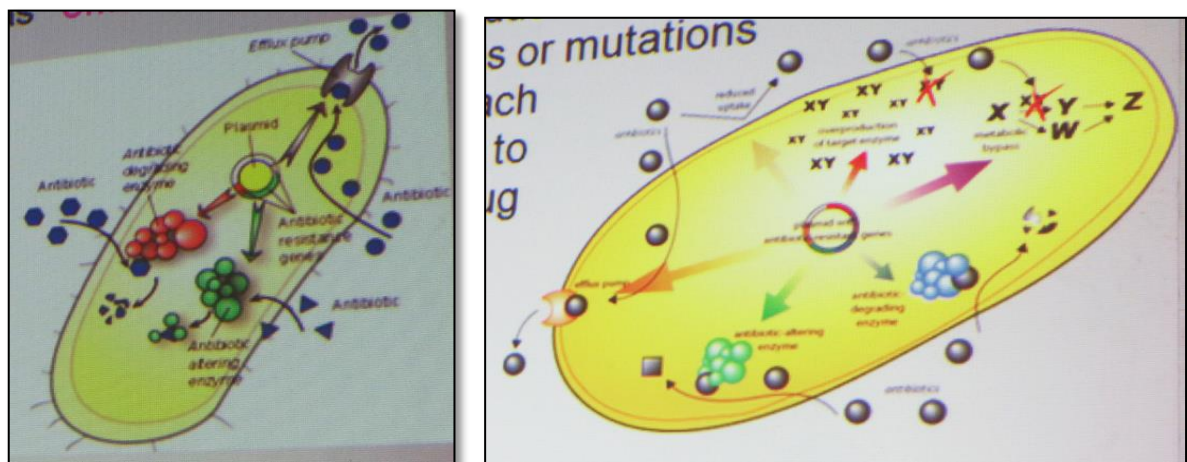


Figura 3 Mecanismos de resistencia a los antibióticos: inactivación del antibiótico por enzimas. Fuente: Apuntes de clases, 2016.

Para conseguir destruir o inhibir a los microorganismos, los antibióticos deben atravesar la barrera superficial de la bacteria y después fijarse sobre su diana, es decir, sobre alguna de las estructuras o mecanismos bioquímicos que le son necesarios para

multiplicarse o para sobrevivir. Los mecanismos de acción de los antibióticos son diversos y a veces múltiples, pero todos operan en alguno de los siguientes puntos: impidiendo la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o de la pared celular o bien alterando la membrana celular de la bacteria sobre la que actúan (Daza, 1998).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

Este trabajo se desarrolló en el municipio de Balancán, localizado en la subregión Ríos, del estado de Tabasco, México. La ganadería es el sector más importante de la economía local, y se practica de manera extensiva. La actividad industrial más importante es la fabricación de quesos, principalmente el queso de poro (Enciclopedia de los Municipios de Tabasco, 2006). Este municipio se encuentra entre las coordenadas 17° 48' latitud norte y entre 91° 32' longitud oeste. Está formado por una extensión de 3,626.10 km² y se encuentra a una altura promedio de 30 msnm, como se muestra en la Figura 4 (Manjarrez et al., 2007).

4.2 Plan de muestreo

Los quesos fueron obtenidos y comprados en una quesería ubicada en la ciudad de Balancán de Domínguez, Tabasco. Con más de 40 años de trabajo, dedicada a la elaboración de quesos artesanales como el queso de hebra, queso crema, cincho, panela, botanero, queso untable y siendo el queso de poro el de mayor tradición. Adquieren la leche para su proceso de productores de al menos 4 comunidades del municipio. Forma parte de la Sociedad Productora de Queso de Poro Genuinos de Balancán S.P.R. de R.L. de C.V.

Del 18 al 23 de julio se analizaron 3 quesos empacados para la venta diaria por cada lote de quesos de poro con 7 días de proceso de la quesería (Anexo 1); haciendo un total de 18 muestras de aproximadamente 150 g de quesos de poro recién empacados para venta. Los quesos fueron transportados en contenedores cerrados al Laboratorio de Microbiología del Instituto Tecnológico Superior de los Ríos, mantenidos a temperatura ambiente.

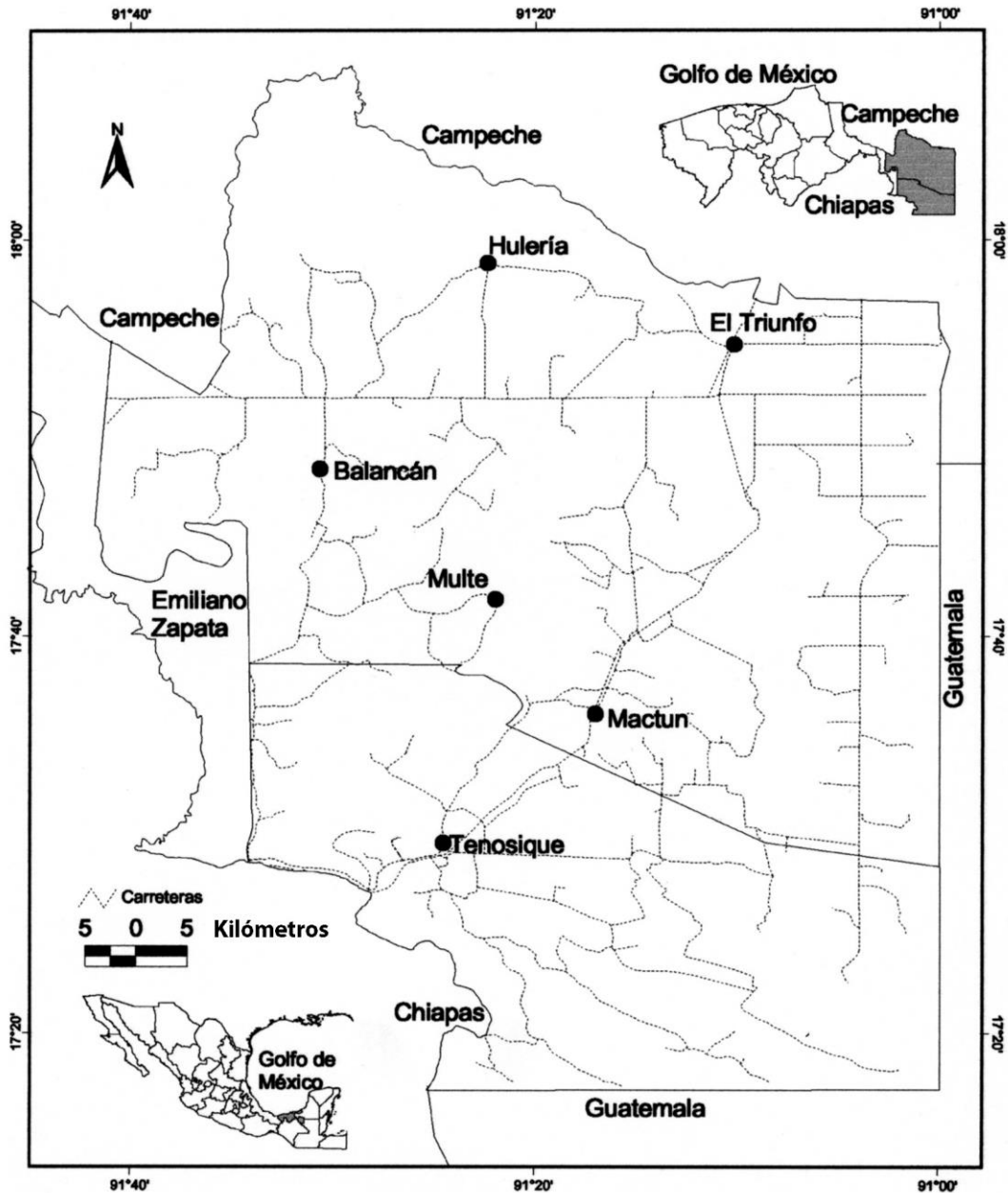


Figura 4 Localización del municipio de Balancán, Tabasco. Fuente: Manjarrez et al., 2007.

4.3 Identificación de bacterias ácido lácticas

Se realizó una dilución 1:10. Se pesó 1.0 g de muestra y se disolvió en 9 mL de solución fisiológica salina estéril. Se tomó 1 mL de la dilución y se inoculó en un tubo con 9 mL de caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe; marca Dibico, código 1269-B), se

incubó por 24 horas a 37 °C y después de transcurrido el tiempo se procedió a sembrar por duplicado mediante la técnica de estría en agar lactobacilos MRS (marca Merck, código 11066), las cajas de Petri se incubaron en anaerobiosis a 37°C durante 48 horas (Rosenblatt *et al.*, 1975).

Se seleccionaron cepas con características típicas de las colonias de bacterias ácido lácticas (se escogieron las bacteria que estuviese más definida y distante de las demás, asumiendo que fuera pura). Las colonias obtenidas fueron cultivadas en agar MRS (medio selectivo para BAL). Posteriormente se realizó la identificación preliminar, evaluando que en la tinción de Gram para las BAL fuera positiva (Tortora *et al.*, 2007) y la prueba de catalasa, que dieran como resultado negativa (Gamazo *et al.*, 2005).

4.4 Prueba de sensibilidad a antibióticos

La metodología utilizada fue la propuesto por Alvarado *et al.* (2007) y la técnica de difusión en agar (disco-placa) método recomendado por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Los antibióticos que se utilizaron son de la marca comercial Investigación Diagnostica (Multibac I.D.), REG. No. 115982002 SSA (Figura 5).

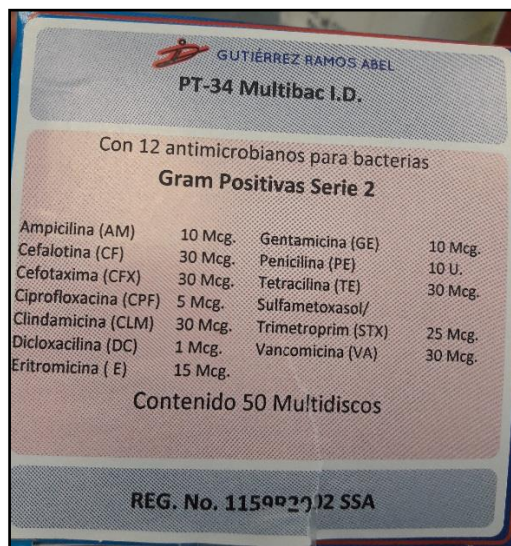


Figura 5 Antibióticos utilizados

El antibiograma o prueba de sensibilidad antimicrobiana tiene como objetivo la evaluación en el laboratorio de un microorganismo frente a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su sensibilidad al mismo como una predicción de su eficiencia clínica. Consiste en depositar discos impregnados con diferentes antibióticos (Figura 6). Tan pronto el disco impregnado de

antibiótico se pone en contacto sobre un medio sólido inoculado con una suspensión de microorganismos, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar, entonces el antimicrobiano difundirá formándose un gradiente de concentración, el cual inhibirá o permitirá el desarrollo de la bacteria (Multibac I.D., s.f.).

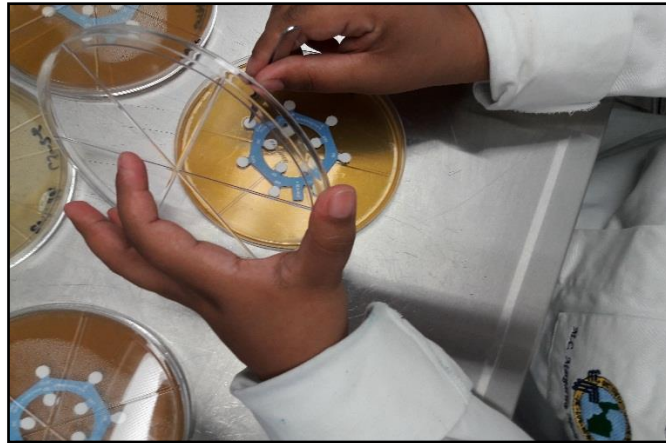


Figura 6 Antibiograma de las bacterias ácido lácticas

La prueba de sensibilidad incluyeron los siguientes pasos (Ver diseño experimental en la Tabla 4):

1) Propagación de la cepa a evaluar. Después de la propagación (caldo MRS incubado por 24 horas a 37 °C) empleando un hisopo se realizó la siembra en agar MRS distribuyendo masivamente en tres direcciones para obtener un inculo uniforme.

2) Se mantendrá a temperatura ambiente unos minutos hasta lograr el secado del medio y con una pinza estéril se tomaran los multidiscos de antibióticos y se colocaran sobre el medio, presionándolo ligeramente para asegurar el contacto con la superficie del agar. La Tabla 2 muestra la clasificación de los antibióticos a evaluar.

3) Las cajas de petri se invirtieron y se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones microaerófilas.

4) Finalmente se procedió a la lectura de los halos de inhibición (en mm) del crecimiento como variable de respuesta. La medición se realizó con una regla y dependiendo del diámetro del halo de inhibición de cada antimicrobiano se consideró

sensible, intermedio o resistente (ver Anexo 2. Tabla de interpretación de halos para cada antibiótico).

4.5 Índice de resistencia múltiple a antibióticos

Se calculó el índice de resistencia múltiple a antibióticos (MAR), el cual se define como a/b , donde “a” representa el número de antibióticos para los cuales determinada cepa presenta resistencia, y “b”, el número de antibióticos al cual se expuso dicha cepa. Un índice mayor a 0.2 indica que la bacteria presenta resistencia múltiple (Vanegas et al., 2009).

Tabla 4 Diseño de experimento

Antibiograma de las cepas puras aisladas del queso de poro, la prueba se realizó por duplicado.

CEPA BAL	ANTIBIÓTICOS (µG)*												MAR
	10 AM	30 CF	30 CFX	5 CPF	30 CLM	1 DC	15 E	10 GE	10 U PE	30 TE	25 STX	30 VA	
BAL 1	B1AM	B1CF	B1CFX	B1CPF	B1CLM	B1DC	B1E	B1GE	B1PE	B1TE	B1STX	B1VA	MAR1
BAL 2	B2AM	B2CF	B2CFX	B2CPF	B2CLM	B2DC	B2E	B2GE	B2PE	B2TE	B2STX	B2VA	MAR2
BAL 3	B3AM	B3CF	B3CFX	B3CPF	B3CLM	B3DC	B3E	B3GE	B3PE	B3TE	B3STX	B3VA	MAR3
BAL 4	B4AM	B4CF	B4CFX	B4CPF	B4CLM	B4DC	B4E	B4GE	B4PE	B4TE	B4STX	B4VA	MAR4
BAL 5	B5AM	B5CF	B5CFX	B5CPF	B5CLM	B5DC	B5E	B5GE	B5PE	B5TE	B5STX	B5VA	MAR5
BAL ∞	B∞AM	B∞CF	B∞CFX	B∞CPF	B∞CLM	B∞DC	B∞E	B∞GE	B∞PE	B∞TE	B∞STX	B∞VA	MAR∞

*las abreviaciones se describen en la Tabla 5

Tabla 5 Modo de acción y concentración de los antibióticos evaluados.

<i>Antibióticos</i>	<i>Concentración</i>	<i>Modo de acción</i>
Cefalotina (CF)	30 µg	Inhibidores de la síntesis de la pared celular β-lactámicos
Ampicilina (AM)	10 µg	
Dicloxacilina (DC)	1 µg	
Penicilina (PE)	10 U	
Cefotaxima (CFX)	30 µg	
Ciprofloxacina (CPF)	5 µg	
Clindamicina (CLM)	30 µg	
Gentamicina (GE)	10 µg	Inhibidores de la síntesis proteica de Aminoglucósidos
Tetraciclina (TE)	30 µg	
Eritromicina (E)	15 µg	
Sulfametoxazol-Trimetoprim (STX)	25 µg	Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos
Vancomicina (VA)	30 µg	

Fuente: Multibac I.D.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación de bacterias ácido lácticas

A partir de 18 muestras de quesos de poro artesanal se aislaron 32 colonias de bacterias con características típicas de las bacterias ácido lácticas y diferente morfología colonial, tales como colonias pequeñas, blancas o cremosas, de superficie convexa con forma redonda y bordes enteros (Figura 7).

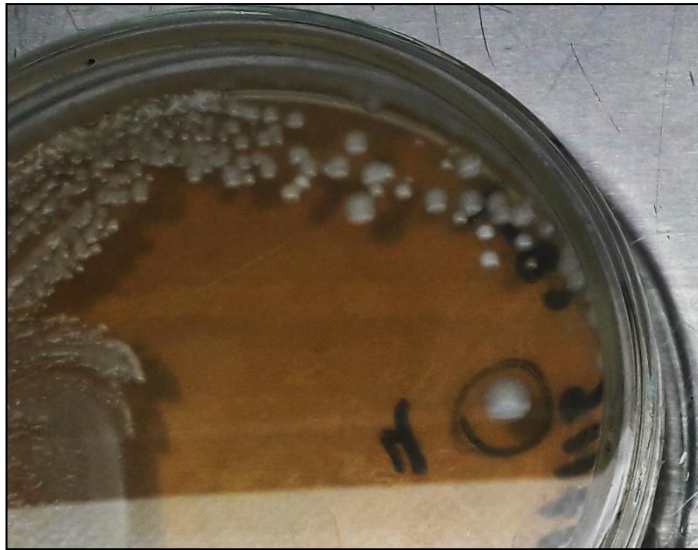


Figura 7 Observación macroscópica de las bacterias ácido lácticas obtenidas

Se realizó tinción de Gram y observaciones microscópicas para verificar la pureza de las BAL, se determinó que de las 32 colonias aisladas se identificaron 30 como bacterias ácido lácticas, al obtener una Tinción de Gram positiva, se identificaron que 9 BAL son cocos y 21 son bacilos; mientras que en la prueba bioquímica de catalasa resultaron negativas (Figuras 8), lo que permitió considerarlas como cultivos puros y libres de cualquier tipo de contaminación para poder así evaluar su susceptibilidad a diferentes antibióticos.

Ramírez et al., (2011) señala que las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características

morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes.

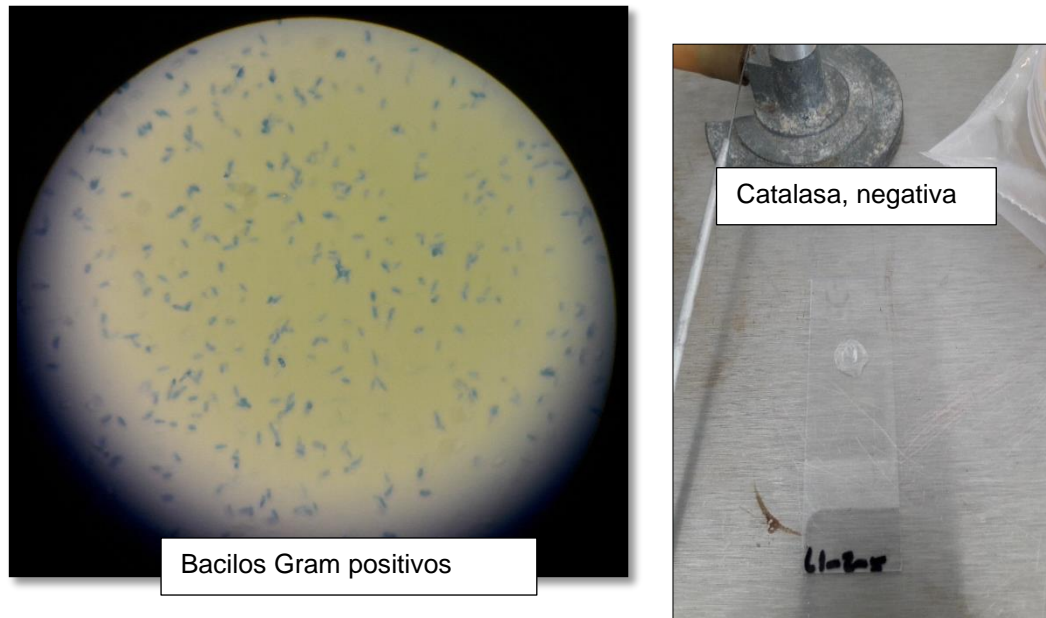


Figura 8 Identificación preliminar de las BAL mediante tinción de Gram, positiva para bacterias ácido lácticas (Tortora et al., 2007) y prueba de catalasa, negativa (Gamazo et al., 2005).

5.2 Prueba de sensibilidad a antibióticos

En la Figura 9 se muestra en el medio MRS a la cepa L1-3-4; la cual presenta crecimiento en toda la placa, incluyendo las zonas vecinas a los discos de los antibióticos, esto indica que hubo una resistencia múltiple a antibióticos, de acuerdo a los criterios de resistencia señalados el anexo 2.



Figura 9 Cepa que presenta resistencia múltiple a antibióticos

En contraparte en la Figura 10, se muestra en el medio MRS a la cepa L1-2-5; la cual presenta ausencia de crecimiento alrededor de todos los discos, significando que esta cepa tiene sensibilidad a antibióticos, de acuerdo a los criterios del anexo 2.

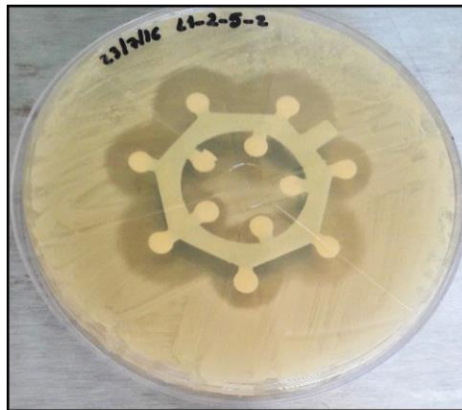


Figura 10. Cepa que presenta sensibilidad a antibióticos

En la Figura 11, se muestra la respuesta a los antibióticos de las BAL aisladas del queso de poro tradicional. Se observa que el perfil de sensibilidad-resistencia no es uniforme en todas las muestras, aun cuando se trata de quesos del mismo lote e incluso de la misma muestra, lo que indica resistencia de algunas cepas, probablemente como resultado del manejo de diferentes lotes.

Como se observa en la Figura 11, de las 30 cepas de BAL que se le realizaron la prueba de sensibilidad solo se representan 17, con la finalidad de mostrar que 14 de las BAL son las que presentan mayor índice de resistencia múltiple a antibióticos (MAR) con valores entre 0.5 y 1; en contraparte 3 BAL fueron las que presentaron menor MAR con un valor de 0.16. Lo anterior considerando que la MAR debe ser menor a 0.2 para decir que la cepa no presenta resistencia múltiple a los antibióticos evaluados (Vanegas et al., 2009). La Tabla con los datos del antibiograma completo se muestra en el anexo 3.

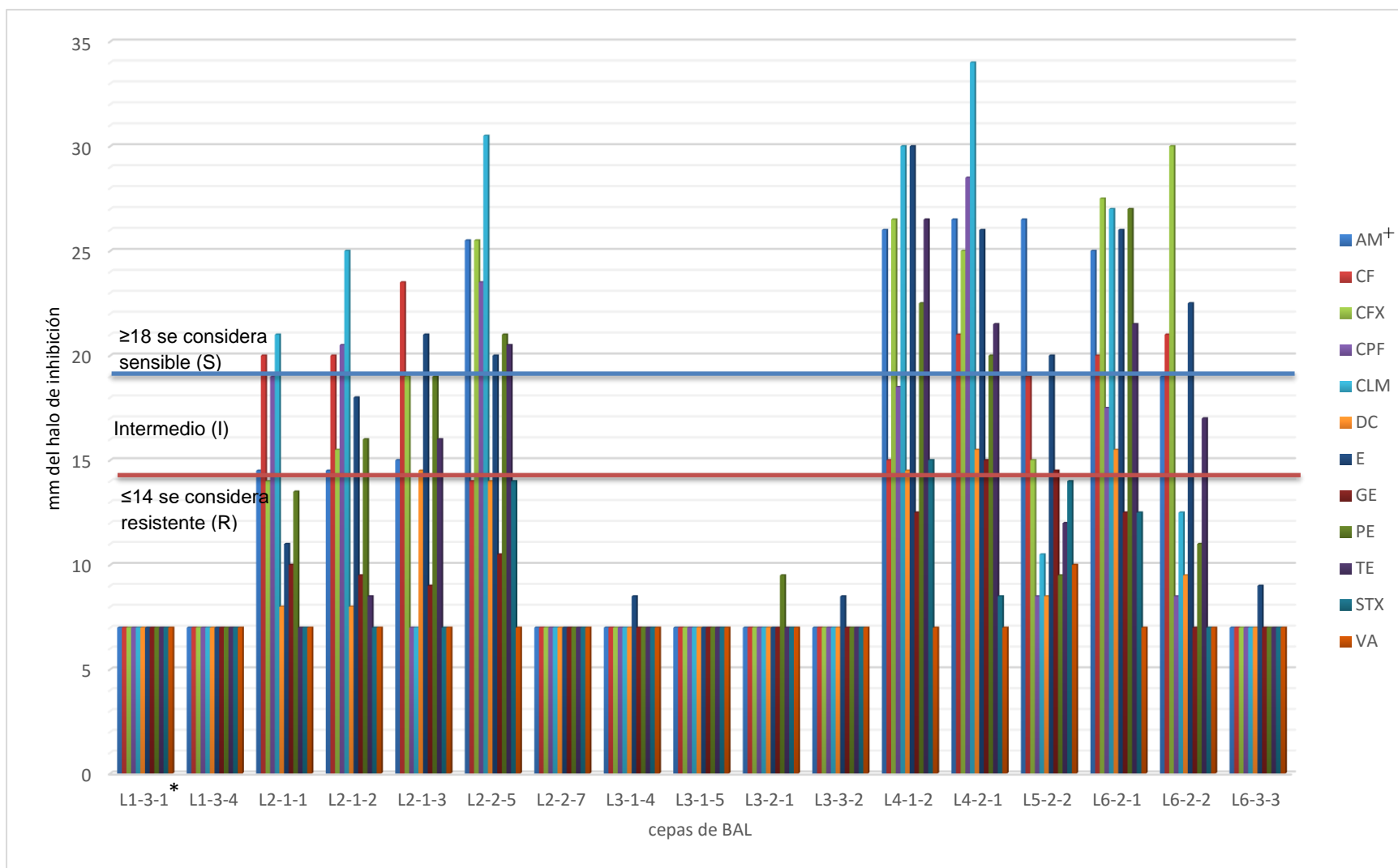


Figura 11. Antibiograma de las cepas puras aisladas del queso de poro tradicional, la prueba se realizó por duplicado.

* Ver nomenclatura de identificación de las BAL en el anexo 1.

+ Ver nomenclatura de identificación de los antibióticos en la Tabla 5.

La mayoría de las cepas presento resistencia a antibióticos, y más aún, resistencia múltiple a los antibióticos.

De acuerdo al índice de resistencia múltiple a antibióticos (MAR), se puede observar que en cuatro de los seis lotes analizados (66.67%) se encontró como mínimo una cepa con resistencia múltiple a los 12 antibióticos (23.33% del total de las cepas). De igual manera, se encontró que 26 (89.7%) de las 30 cepas estudiadas presentan un índice mayor a 0.2 lo que indica que la bacteria presenta resistencia múltiple (Vanegas et al., 2009).

En general, los antibióticos a los que presentaron mayor resistencia las BAL fueron: Vancomicina (96.6%), sulfametoxazol-trimetoprim (73.33%), gentamicina (90%), dicloxacilina (53.33%) y tetraciclina (50%); sin embargo, presentan mayor sensibilidad a la eritromicina (75.9%), cefotaxima (69%) y penicilina (65.5%).

Como se observa en la Figura 11 todas las cepas de BAL son resistentes a la vancomicina a una concentración de 30 µg. Swenson, (1990) indica que la vancomicina ejerce su efecto bactericida inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, ya que posee gran afinidad por los precursores de esta estructura. Su modo de acción se basa en alterar la acción de la transglucosidasa por impedimento estérico.

El resultado obtenido concuerda con lo estipulado por Swenson, (1990) quien indica que hay algunas bacterias Gram-positivas que son intrínsecamente resistentes a la vancomicina, como las especies *Leuconostoc* y *Pediococcus*, aunque estos organismos son poco comunes como patógenos que provoquen enfermedades en los seres humanos.

Al igual que la mayoría de las especies de *Lactobacillus* que también son intrínsecamente resistentes a la vancomicina, sin embargo, Hamilton-Miller (1998) indica que hay la excepción debido al hallazgo de unas pocas cepas (pero no todas) de *Lactobacillus acidophilus*. Otras bacterias Gram-positivas con resistencia intrínseca a la vancomicina incluyen *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Weissella confusa*, y *Clostridium innocuum*. Todas estas bacterias resistentes a la vancomicina se denominan bacterias

vancomicina-resistentes.

De igual manera se debe considerar la propagación de la resistencia a vancomicina entre enterococos de diversos orígenes siendo otro ejemplo de propagación de resistencias entre bacterias Gram (+). Se han aislado enterococos resistentes a vancomicina (VRE) con cluster gen vanA en el hombre y en diversas especies animales como cerdo, conejo, perro, gato, caballo, pollo, pavo, faisán, pato, también en alimentos de origen animal y en aguas residuales (Klare et al., 1995).

De las cepas ensayadas frente a gentamicina, la que presentó susceptibilidad fue la cepa L4-2-1 al tener un halo de 15.00 ± 0.00 mm, la cepa L5-2-2 presentó crecimiento intermedio con un halo de 14.50 ± 0.70 mm, mientras que las 26 cepas restantes son resistentes al mostrar un halo de inhibición menor a 14 mm para este mismo antibiótico.

La Gentamicina es un aminoglucósido considerado bactericida rápido que inhibe la síntesis proteica bacteriana y altera la integridad de la membrana citoplasmática. Rodríguez. 2002 (citado en Sabido, 2009) indica que la resistencia a este antibiótico está mediada por plásmidos, que diseminan el código genético de las enzimas no sólo entre colonias de la misma especie, sino transespecie, lo que ha representado uno de los principales hechos que aumenta la complejidad del control de la resistencia.

Es así como muchos de los microorganismos inicialmente sensibles a estos medicamentos se vuelven resistentes. Mesas, (2006) señala que en cuanto a bacterias lácticas probióticas, existe evidencia sobre la transferencia horizontal de plásmidos entre especies de bacterias lácticas. Así como desde otras especies Mater, 2008 (citado en Sabido, 2009).

En cuanto al sulfametoxazol-trimetoprim, Cué (citado en Sabido, 2009) indica que usualmente es bacteriostático e interfiere con la síntesis del ácido fólico, actuando como inhibidor competitivo del ácido p-aminobenzoico en los microorganismos susceptibles. Su espectro de acción es amplio, abarca la mayoría de los microorganismos grampositivos y muchos gramnegativos, especialmente estos últimos, pero su uso se ha limitado debido al desarrollo de resistencia. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, debido a que el 73.33% las cepas de BAL muestran resistencia al sulfametoxazol-

trimetoprim en una concentración de 25 µg.

Dicloxaciclina es un antibiótico de la familia de los betalactámicos, es una penicilina resistente a penicilinasas. Anti Gram +, ejerce su acción bactericida sobre el crecimiento y división de la pared celular bacteriana, aunque aún no se conoce exactamente el mecanismo de acción implicado. Los peptidoglicanos mantienen la pared celular bacteriana rígida, protegiendo a la bacteria contra ruptura osmótica. Las bencilpenicilinas inhiben el paso final de la unión de peptidoglicano mediante su unión a transpeptidasas, proteínas fijadoras de penicilinas, que se encuentran en la superficie interior de la cubierta celular bacteriana, inactivándolas.

Sin embargo, en este estudio la susceptibilidad solo se presentó en un 37.9%; siendo las cepas L3-2-6, L4-2-1 y L6-2-1 las más susceptibles a 1 µg de dicloxaciclina dado que la primera mostro un halo de inhibición de 17.00 ± 0.00 mm y las otras dos un halo de 15.50 ± 0.70 mm. En contraparte el 55% de las cepas mostraron resistencia a este antibiótico mientras que las cepas L1-3-2 y L6-2-1 presentan resistencia intermedia.

Lo que respecta a la tetraciclina, en el año 2005, Zhou y col. (citado por Mora, 2007) encontraron que cepas con potencial probiótico de *Lb. rhamnosus* y *Lb. plantarum* fueron susceptibles a 30 µg de este antibiótico. En el mismo año Herreros y col. reportaron susceptibilidad a 30 µg para cepas de *Lb. plantarum*, aisladas a partir de queso elaborado artesanalmente. Por el contrario, Flórez y col. (2005) (citado por Mora, 2007) encuentran cepas de *Lb. plantarum* resistentes a tetraciclina, al determinar una CMI de 256 µg/mL.

Sin embargo, en este estudio la cepa L4-1-2 resultó la más susceptible, al ser inhibida en un diámetro de 26.5 ± 2.12 mm por la concentración de 30 µg de tetraciclina (Figura 12) y en total solo el 31% de las BAL presentaron susceptibilidad.



Figura 12. Cepa L4-1-2 inhibida por tetraciclina

En contra parte más del 50% de las cepas presentaron resistencia a este antibiótico, siendo las cepas *L1-3-1*, *L1-3-4*, *L2-1-1*, *L2-2-7*, *L3-1-4*, *L3-1-5*, *L3-2-1*, *L3-2-2* y *L6-3-3* las que mostraron mayor resistencia al presentar un diámetro de 7.00 ± 0.00 mm (Figura 13). Este es un resultado no esperado debido a que las tetraciclinas son capaces de inhibir la síntesis de las proteínas en las bacterias, se unen a la subunidad ribosomal 30S y producen la acumulación de complejos iniciales de la síntesis proteica, lectura errónea del código ARNm y producción de polipéptidos anormales que se comportan como bactericidas (Cordiés y col., 1998).



Figura 13. Cepa *L1-3-4* resistente a tetraciclina a la concentración de $30 \mu\text{g}$

Continuando con estudios realizados por Danielsen y Wind (2003), Coppola y col. (2005) (citado por Mora, 2007) con respecto a los inhibidores de la síntesis de pared celular, señalan que los lactobacilos son frecuentemente sensibles a ampicilina y penicilina.

Sin embargo, el 58.6% de las cepas fueron susceptible a la concentración de $10 \mu\text{g}$ de ampicilina, mientras que el resto fue resistente a esta concentración del antibiótico. De las BAL ensayadas contra la penicilina, *L2-2-5* y *L3-3-3* fueron las más susceptibles mostrando halos de 31.50 ± 2.12 mm y 30 ± 0.00 mm respectivamente. Por otro lado, el 37.9% de las cepas presentaron una inhibición intermedia y siendo las cepas *L1-3-4*, *L2-2-7*, *L3-1-4*, *L3-1-5*, *L3-3-2* y *L6-3-3* (7.00 ± 0.00 mm) las más resistentes.

La resistencia a los antimicrobianos presentada por las BAL estudiadas puede ser de forma natural o adquirida, en este caso es probable que la resistencia se relacione con la penicilina que es recomendada para el tratamiento de la mastitis, debido a que esta es propensa a generar resistencia bacteriana y al tener un tiempo de retiro entre siete a catorce días (Solimano, 2011) es un tiempo bastante considerable que quizá el productor no espera para realizar la ordeña y distribución a las queserías de la leche obtenida.

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

En raros casos los cocos Gram positivos pueden inactivar la clindamicina por mecanismos enzimáticos, hecho que parece no tener importancia clínica (Leclercq, 2002). Sin embargo, como se observa en la Figura 14, de las BAL ensayadas contra clindamicina, el 51.7% fueron sensibles; siendo la cepa *L4-2-1* la más susceptible mostrando halo de 34.00 ± 1.41 mm. Por otro lado, la cepa *L2-2-8* presento una resistencia intermedia y se encontró que el 44.8% de las cepas son resistentes con halos de inhibición de 7.00 ± 0.00 mm.

La susceptibilidad obtenida tiene relación con los estudios realizados por Charteris y col. (1998), Coppola y col. (2005) y Zhou y col. (2005) donde han encontrado que *Lactobacillus* es generalmente susceptible a antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas tal como clindamicina; sin embargo, podemos observar que en este estudio es considerable el porcentaje de BAL resistentes a este antibiótico.

Por último, la eritromicina aumenta su actividad en un pH alcalino, en concentraciones de 0.1 a 2 $\mu\text{g/mL}$ es activa contra microorganismos Gram positivos, incluyendo neumococos, estreptococos y corinebacterias. *Mycoplasma*, *Clamydia trachomatis*, *Legionel a pneumophila* y *Campylobacter jejuni* son susceptibles también. En este trabajo se obtuvo que un 65.5% de las cepas de BAL evaluadas fueron

susceptibles a la eritromicina; siendo la cepa L4-1-2 la que mayor susceptibilidad presenta con un halo de inhibición de 30.00 ± 0.00 mm, y las cepas con mayor resistencia son la L1-3-4 y L2-2-7 al presentar halos de 7.00 ± 0.00 mm.

Estos datos tienen relación con los estudios realizados por Mora, et al. (2007) al evaluar la susceptibilidad del género *Leuconostoc* ante este fármaco el cual inhibe la síntesis de proteínas, observó homogeneidad en la respuesta al antibiótico obteniéndose una CMI de $10 \mu\text{g/mL}$, siendo las cepas *Leuc. Mesenteroides* subesp. *Mesenteroides* 0104 y 2106 la más resistente y susceptible respectivamente, al presentar halos de inhibición de 7.33 ± 0.58 mm y 11.33 ± 2.31 mm.

En la actualidad la eritromicina se encuentra aprobada por la FDA y la OMS, estableciendo un límite máximo de residuos de $0.05 \mu\text{g/mL}$ y de $0.04 \mu\text{g/mL}$ en leche con la finalidad de no generar resistencia a las bacterias presentes y evitar intoxicaciones o enfermedades a los consumidores.

En general, el empleo de las BAL que mostraron resistencia no serían muy factibles en la detección de residuos de estreptomicina en leche, debido a la resistencia que presentan (Ramírez, 2005). Sin embargo, si se considera el uso de estas cepas como cultivo iniciador sería de gran utilidad, por el potencial inhibitorio que posiblemente presenten contra microorganismos patógenos y deterioradores de alimentos.

De igual manera Solimano, (2011) indica que algunos antibacterianos utilizados en animales pueden provocar efectos adversos en las personas que los consumen. Entre los principales se encuentran las reacciones tóxico-alérgicas, efectos tóxicos por exposición prolongada a niveles bajos de antibacterianos, desarrollo de resistencia antimicrobiana e interrupción de la flora intestinal normal del humano (Ellin, 2006 citado por Solimano, 2011).

De ellos la resistencia a los antimicrobianos es la principal preocupación, debido a que los tiempos de retiro varían de antimicrobiano a antimicrobiano, es de suma importancia conocerlos a fin de evitar que lleguen a consumo humano productos o subproductos que los contengan.

Por otro lado, Mora. et al., (2007) indica que las BAL no susceptibles a los diferentes antibióticos podrían ser utilizadas en la manufactura de productos lácteos, sobre todo si hay residuos de antibióticos en la leche como consecuencia de terapia en los animales, ya que puede afectar el desarrollo de las bacterias que se emplean como cultivos iniciadores, lo que podría permitir el desarrollo de bacterias indeseables como *S. aureus* o cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos .

De igual manera es importante considerar que las BAL aisladas del queso de poro artesanal son bacterias no patógenas, aunque la mayoría presentan resistencia múltiple a los antibióticos no son peligrosas. Sin embargo, el riesgo que se presenta es que la gravedad de las infecciones por bacterias oportunistas está muy aumentada por las resistencias.

Al respecto Errecalde, (2004) indica que el conocimiento de este fenómeno, ignorado en su magnitud hasta hace pocos años, ha revolucionado el ambiente médico. Al existir la posibilidad de que las bacterias intercambien material genético y con el mismo, resistencias, puede incrementar enormemente la diseminación de los microorganismos resistentes. La resistencia está codificada en ADN extracromosómico que se autoduplica dentro de la bacteria y es transferido a otras por varios mecanismos.

Los genes que codifican resistencia a antibióticos fluyen desde y hacia bacterias Gram positivas y Gram negativas y bacterias que habitan nichos extremadamente diferentes (Levy, 1997, citado por Errecalde, 2004). Las transferencias “horizontales”, entre géneros bacterianos diferentes, son, lamentablemente, frecuentes.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han recomendado reducir el uso de antibióticos; una de las alternativas, es el uso de probióticos. Collado, (2004) realizó un estudio donde evidencia la habilidad de algunas cepas del género *Bifidobacterium*, integrantes de la flora intestinal endógena de niños y adultos, de producir compuestos con actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de microorganismos. Esta propiedad podría constituir un mecanismo adicional de las *bifidobacterias* para participar en la defensa del huésped contra microorganismos patógenos y reforzar su

competitividad en los diversos ecosistemas así como jugar un papel en la conservación de los alimentos.

De igual manera, para el tratamiento de infecciones de *Helicobacter pylori* se suele emplear una combinación de antibióticos (amoxicilina, claritromicina, o nitroimidazoles) junto a compuestos supresores de ácidos (fármacos inhibidores de la bomba de protones y antagonistas de H₂-receptores), en triples o cuádruples combinaciones (Hamilton-Miller, 2003 citado por Collado, 2004). Estos tratamiento presentan elevado porcentajes de eliminación de la infección (>90%), pero poseen efectos secundarios entre los que destaca la aparición de resistencias a los antibióticos empleados en el tratamiento de H .pylori (Matsumoto et al., 1997 citado por Collado, 2004). La resistencia a metronidazol y en particular a la claritromicina son factores que, en la actualidad, están limitando la eficacia de los tratamientos contra esta infección (Graham, 2000 citado por Collado, 2004). A consecuencia de estos hechos es necesario desarrollar nuevos tratamientos.

El géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* constituyen el origen principal de microorganismos probióticos; se han empleado con buenos resultados en la prevención y/o tratamiento de infecciones intestinales y recientes estudios han evidenciado su papel en el tratamiento contra H. pylori (Hamilton-Miller, 2003; Ouwehand et al., 2000 citado por Collado, 2004).

Sin embargo, se reconoce que algunos *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* pueden tener resistencia intrínseca a algunos antibióticos. Cuando el gen o los genes que confieren resistencia es de origen cromosomal y no está asociado a ningún elemento genético móvil, no es inmediatamente transferible y por lo tanto, el riesgo de la trasmisión de esta resistencia es mínima (European Food Safety Authority, 2008 citado por Vélez, 2014).

Como consecuencia de esto, existe la necesidad de buscar alternativas viables que podrían mejorar los mecanismos naturales de defensa de las personas y reducir el uso masivo de antibióticos, es por ello que se han introducido los probióticos como una solución alternativa promisoría y es objetivo de este proyecto el caracterizar

completamente las cepas aisladas del queso de poro con la finalidad de determinar si se pueden considerar probioticos o no.

6. CONCLUSIONES

Se evaluó la sensibilidad a los antibióticos de las BAL aisladas de queso de poro; se encontró que 3 (10%) de las 30 cepas estudiadas presentan un índice menor a 0.2 lo que indica que las BAL presentan sensibilidad a los antibióticos evaluados.

En general estas cepas presentan sensibilidad a la mayoría de los antibióticos, solo presentaron resistencia a la vancomicina y a la gentamicina; En algunos de los antibióticos nos indican que la resistencia es propia de las BAL como en el caso de la vancomicina. Por lo tanto, cumplen con la seguridad biológica y se pueden considerar de utilidad en la detección de residuos de antibióticos a las concentraciones ensayadas. Además de que las cepas podrían ser empleadas como cultivos iniciadores.

El 90% de las cepas restantes, presentaron resistencia múltiple a los antibióticos. Mostrando mayor resistencia a la vancomicina (96.6%), sulfametoxazol-trimetoprim (73.33%), gentamicina (90%), dicloxacilina (53.33%) y tetraciclina (50%). La resistencia presentada puede ser adquirida; en este caso es probable que se relacione con antibióticos recomendados para el tratamiento de las enfermedades de las vacas, al no cumplir con el tiempo de retiro para realizar la ordeña y distribución a las queserías de la leche obtenida.

7. RECOMENDACIONES

- Identificar las cepas a nivel de género y especie.
- Continuar con la caracterización de las cepas que presentaron sensibilidad con la finalidad de proponer su utilización en diversas aplicaciones tecnológicas.
- Considerando la seguridad para el consumidor, se debe concientizar a los proveedores de leche de la región para que realicen el uso propio y selectivo del medicamento veterinario autorizado; teniendo siempre en cuenta el problema de los residuos que pueden originarse al incumplir en las dosis y tiempos de espera o de retirada para poder distribuir la leche a las queserías para su proceso.

8. LITERATURA CITADA

- [1] Acosta, H. (2009). *Comportamiento de la flora microbiana asociada al proceso de maduración del queso de poro*. Tesis de la Licenciatura Ingeniería en Alimentos. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica Multidisciplinaria de los Ríos. Tenosique, pp 41.
- [2] Alejo-Martínez, K., Ortiz-Hernández, M., Recino-Metelín, B., González-Cortés, N. y Jiménez-Vera, R. (2015). Tiempo de maduración y perfil microbiológico del queso de poro artesanal. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2, 5, 15-24.
- [3] Alvarado, C., Chacón, Z., Rojas, J., Guerrero, B. y López, G. (2007). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso venezolano ahumado andino artesanal. Su uso como cultivo iniciador. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 17, 3, 301-308.
- [4] Alvarado-Rivas, C. y Díaz-Rivero, C. (2009). Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. *Rev Fac Farm.*, 51, 1, 8-14.
- [5] Amorocho, C. (2011). *Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra*. Primera edición. Editorial Universitat Politècnica de València. Valencia.
- [6] Bartlett, J. G. (1990). *Clostridium difficile: clinical considerations*. *Rev. Infect. Dis.* 12:S244.
- [7] Bello, J. y Fernández, E. (2006). Transferencia de material genético entre bacterias en ambientes acuáticos ¿Un problema de salud pública?. *Revista Digital Universitaria*, 7, 11. Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.7/num11/art89/int89.htm>
- [8] Bolívar-González, S., Talero, E. y Motilva, V. (2015). Efectos de un preparado probiótico en un modelo de colitis experimental crónica en ratones, inducida por la ingesta de dextrano sulfato sódico (DSS). *Cienc. innov. salud.* 3, 1, 33-44.
- [9] Brizuela, M., Serrano, P. y Pérez, Y. (2001). Studies on probiotics properties of two *Lactobacillus* strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44, 1, 95-99.
- [10] Cabrera-Cao, Y. y Fradagas-Fernández, A. (2005). Probióticos y salud: una reflexión necesaria. *Rev Cubana Med Gen Integr*, 21, 3-4.

- [11] Cervantes-Contreras, M. y Pedroza-Rodríguez, A. (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *NOVA, Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 5, 8, 101-212.
- [12] Charteris, W., Kelly, P., Morelli, L. y Collins J. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiótic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 5, 333-337.
- [13] Conway, P. (1996). Selección criteria for probiotic microorganisms. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, 5, 10-14.
- [14] Collado, M. C. (2004). Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. 150-200. España.
- [15] Enciclopedia de los Municipios de Tabasco. Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal. Villahermosa, Tabasco. Gobierno del Estado de Tabasco. 2006. pp 96.
- [16] Escalante, A. (2001). El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 3, 3, 106-114.
- [17] Errecalde, J. O. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. FAO, producción y sanidad animal, 11-56. Roma.
- [18] Ferreira, B., Marçal, S., Duarte, R. y Nicoli, J. (2001). Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *Bifidobacterium bifidum* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46. *Revista de Biología e Ciências da Terra*, 1, 2.
- [19] Florez, A. (2007). Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo, España.
- [20] Hammes, W. P., & Hertel, C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. (pp. 320-403) In. Dworkin, M. S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.). *The prokaryotes: Vol. 4: Bacteria: Firmicutes*, Springer Science & Business Media.
- [21] Hamilton-Miller JM, Shah S (1998). Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Lett Appl Microbiol* 26 (2): 153-4.

- [22] Jay, J. M. (2000). Microbiología moderna de los alimentos. 4ª ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 19-27, 106-108, 441-475.
- [23] Klare, I.; Heier, H.; Claus, H.; Reissbrodt, R. and Witte, W (1995): vanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. FEMS Microbiology letters, 125, 165-172.
- [24] Magariños, H. H. (2000). Producción higiénica de la leche cruda, una guía para la pequeña y mediana empresa. Ed. Producción y Servicios Incorporados S.A., Guatemala, Guatemala. pp. 53-58.
- [25] Manjarrez, B., Hernández, S., De Jong, B., Nahed, J., De Dios, O. y Salvatierra, E. (2007). Configuración territorial y perspectivas de ordenamiento de la ganadería bovina en los municipios de Balancán y Tenosique, Tabasco. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía*, 64, 90-115.
- [26] Martín, B. (2005). Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica. Tesis de doctorado. Centro de Tecnología de la Carne de la Universidad de Girona. Girona. p 266.
- [27] Martín del Campo M., Cástulo, I., Gómez, H., Héctor, E., Alaníz de la O, R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *e-Gnosis*, 6, 1-17.
- [28] Mater, D., Langella, P., Corthier, G. y Flores, M. (2008). Probiotic *Lactobacillus* Strain Can Acquire Vancomycin Resistance during Digestive Transit in Mice. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14, 123-127.
- [29] Mejía, J., Chacón, Z., Guerrero, B., Otoniel, J. y López, G. (2007). Obtención de cepas de *Lactobacillus*: caracterización *in Vitro* como potenciales probióticas. *Revista Científica*, 17, 2, 178-185.
- [30] Mesas, J., Rodríguez, M. y Alegre, M. (2006). pRS4: Un vector de clonación idóneo para bacterias ácido-lácticas de uso alimentario. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5, 2, 118-123.
- [31] Moreno-Villares, J. (2006). Flora bacteriana intestinal. *Anales de Pediatría*, 4, 1, 12-19.

- [32] NCCLS. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; seventeenth Informational Supplement M100-S17. Vol. 27 No. 1 January 2007.
- [33] Ramírez, J., Rosas, P., Velázquez, M., Ulloa, J y Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 2, 7, 1-16.
- [34] Rosenblatt, J., Stewart, P. (1975) Anaerobic bag culture method. *Journal of Clinical Microbiology*. 1,6, 527-550.
- [35] Sabido, L. B. (2009). Resistencia a los antibióticos de las bacterias probióticas aisladas de bebidas lácteas fermentadas comerciales. Mérida, Yucatán, México, 19-20.
- [36] Solimano, G. M; et al. (2011). Antibacterianos de empleo frecuente en ganado bovino destinado a la producción de leche y carne en Lima, Perú. *Revista Sapuvet de Salud Pública*, 2, 2, 81-94
- [37] Swenson JM, Facklam RR, Thornsberry C (1990). «Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species». *Antimicrob Agents Chemother* 34, 4, 543-9
- [38] Taranto, M., Medici, M., Front, V. (2005). Alimentos Funcionales Probióticos. *Revista Química Viva*, 4, 1, 26-34.
- [39] Vanegas, M., Correa, N., Morales, A., Martínez, A., Rúgeles, L. y Jiménez, F. (2009). Resistencia a antibioticos de bacterias aisladas de biopelículas en una planta de alimentos. *Rev. MVZ Córdoba*, 14, 2, 1677-683.
- [40] Vélez, J. M. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias probióticas extraídas del calostro de cerdas de granjas del Aburrá sur. 60-67. Colombia.
- [41] Von wright, A. and Axxelson, L. 2011. Lactic acid bacteria: an Introduction. En Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. CRC Press.
- [42] Walstra, P., Wouters, J. T., & Geurts, T. J. (2005). *Dairy science and technology*. CRC press.

9. ANEXO

Anexo 1. Muestras analizadas y cepas obtenidas

Lote (fecha)	Quesos	Muestra	cepas aisladas por muestra	Nomenclatura de identificación	Total de cepas aisladas por lote
1	3	1	1	L1-1-6	7
		2	2	L1-2-5 L1-2-7	
		3	4	L1-3-1 L1-3-2 L1-3-3 L1-3-4	
2	3	1	4	L2-1-1 L2-1-2 L2-1-3 L2-1-4	9
		2	4	L2-2-5 L2-2-6 L2-2-7 L2-2-8	
		3	1	L2-3-9	
3	3	1	2	L3-1-4 L3-1-5	6
		2	2	L3-2-1 L3-2-6	
		3	2	L3-3-2 L3-3-3	
4	3	1	1	L4-1-2	2
		2	1	L4-2-1	
		3	0	-	
5	3	1	1	L5-1-4	4
		2	2	L5-2-1 L5-2-2	
		3	1	L5-3-3	
6	3	1	1	L6-1-4	4
		2	2	L6-2-1 L6-2-2	
		3	1	L6-3-3	
Total	18 quesos				32 cepas

Anexo 2. Tabla de interpretación de halos para cada antibiótico

TABLA DE COMPARACIÓN DE HALOS DE SENSIBILIDAD EN mm (NCCLS)					
Clave – antibiótico	Concentración	R Iguual o menor	I Entre	S Iguual o mayor	
(AK) Amikacina _s	30 mcg	14	15-16	17	
(AM) Ampicilina	10 mcg	≤ 14	15-16	≥ 17	
Enterobacteriaceae		11	12-13	14	
Staphylococcus sp.		28	----	29	
Enterococos		16	----	18	
Estreptococos		21	----	30	
(CB) Carbenicilina	100 mcg				
Enterobacteriaceae		18	18-22	23	
Pseudomonas sp.		13	14-16	17	
(CF) Cefalotina	30 mcg	14	15-17	18	
(CFX) Cefotaxima	30 mcg	14	15-22	23	
(CTZ) Ceftazidima	30 mcg	14	15-17	18	
(CTX) Ceftriaxona	30 mcg	13	----	21	
(CXM) Cefuroxima	30 mcg	14	15-17	18	
(CPF) Ciprofloxacina	5 mcg	15	16-20	21	
(CLM) Clindamicina	30 mcg	14	15-20	21	
(CL) Cloranfenicol	30 mcg	12	13-17	18	
(DC) Dicloxacilina	1 mcg	--	----	--	
Staphylococcus sp.		10	11-12	13	
(ENX) Enoxacina	10 mcg	14	15-17	18	
(E) Eritromicina	15 mcg	13	14-17	18	
(GE) Gentamicina	10 mcg	12	13-14	15	
(NET) Netilmicina	30 mcg	12	13-14	15	
(NF) Nitrofurantoína	300 mcg	14	15-16	17	
(NOF) Norfloxacina	10 mcg	12	13-16	17	
(PE) Penicilina	10 U	≤ 14	15-22	≥ 23	
Enterococos		14	----	15	
Estreptococos		19	20-27	28	
Staphylococcus sp.		28	----	29	
N. gonorrhoeae		19	----	20	
Neumococos		19	----	20	

Fuente: Multibac I.D.

Anexo 3. Antibiograma completo de las cepas de BAL aisladas del queso de poro

Secuencia	Cepa BAL	Antibióticos (µg)																							
		10		30		30		5		30		1		15		10		10U		30		25		30	
		AM		CF		CFX		CPF		CLM		DC		E		GE		PE		TE		STX		VA	
		\bar{x} (mm)	S (±)	\bar{x} (mm)	S (±)	\bar{x} (mm)	S (±)	\bar{x} (mm)	S (±)	\bar{x} (mm)	S (±)	\bar{x} (mm)	S (±)	\bar{x} (mm)	S (±)	\bar{x} (mm)	S (±)	\bar{x} (mm)	S (±)	\bar{x} (mm)	S (±)	\bar{x} (mm)	S (±)	\bar{x} (mm)	S (±)
1	L1-1-6	14.5	0.70711	17	4.24264	22	1.41421	7	0	8.5	0.70711	14	0	18.5	0.70711	8	1.41421	17	0	14.5	2.12132	11.5	0.70711	7	0
2	L1-2-5	25.5	2.12132	14	0	25.5	0.70711	23.5	0.70711	30.5	0.70711	14	0	20	0	10.5	0.70711	21	0	20.5	0.70711	14	0	7	0
3	L1-2-7	29	1.41421	14	0	22.5	2.12132	18.5	2.12132	24.5	0.70711	14	0	18	1.41421	8.5	2.12132	18.5	0.70711	17.5	3.53553	8.5	2.12132	7	0
4	L1-3-1	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	15	7.07107	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0
5	L1-3-2	34	1.41421	22.5	3.53553	21.5	4.94975	17.5	3.53553	24	1.41421	12	2.82843	17.5	3.53553	11	1.41421	22.5	10.6066	15.5	6.36396	8.5	2.12132	7	0
6	L1-3-3	18.5	0.70711	14.5	0.70711	20.5	0.70711	16	1.41421	25.5	0.70711	14	1.41421	24.5	2.12132	11.5	2.12132	19	1.41421	24	1.41421	14	1.41421	7	0
7	L1-3-4	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0
8	L2-1-1	14.5	2.12132	20	0	14	0	19	0	21	1.41421	8	0	11	2.82843	10	0	13.5	2.12132	7	0	7	0	7	0
9	L2-1-2	14.5	3.53553	20	0	15.5	2.12132	20.5	0.70711	25	0	8	1.41421	18	1.41421	9.5	0.70711	16	1.41421	8.5	2.12132	7	0	7	0
10	L2-1-3	15	0	23.5	2.12132	19	1.41421	7	0	7	0	14.5	0.70711	21	1.41421	9	1.41421	19	1.41421	16	2.82843	7	0	7	0
11	L2-1-4	17	0	23	1.41421	20	0	22.5	0.70711	30	0	7.5	0.70711	20.5	0.70711	11.5	0.70711	19.5	2.12132	10.5	2.12132	7.5	0.70711	7.5	0.7071
12	L2-2-5	25	0	14	0	33.5	2.12132	8	1.41421	8	1.41421	10	0	29.5	0.70711	7	0	31.5	2.12132	24.5	0.70711	11	1.41421	15.5	0.7071
13	L2-2-7	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0
14	L2-2-8	32	2.82843	27.5	3.53553	23.5	0.70711	13	2.82843	17.5	0.70711	14	0	19.5	0.70711	10	0	25	0	9.5	0.70711	7	0	7	0
15	L3-1-4	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	8.5	0.70711	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0
16	L3-1-5	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0
17	L3-2-6	22	0	20	0	15	0	20	0	29	0	17	0	20	0	10	0	15	0	20	0	7	0	7	0
18	L3-2-1	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	9.5	0.70711	7	0	7	0	7	0
19	L3-3-2	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	8.5	0.70711	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0
20	L3-3-3	30	0	20	0	22	0	20	0	26	0	15	0	20	0	8	0	30	0	14	0	7	0	7	0
21	L4-1-2	26	1.41421	15	0	26.5	2.12132	18.5	0.70711	30	0	14.5	0.70711	30	0	12.5	0.70711	22.5	3.53553	26.5	2.12132	15	0	7	0
22	L4-2-1	26.5	0.70711	21	1.41421	25	0	28.5	2.12132	34	1.41421	15.5	0.70711	26	2.82843	15	0	20	0	21.5	0.70711	8.5	2.12132	7	0
23	L5-1-4	31.5	2.12132	23.5	2.12132	23.5	4.94975	19.5	0.70711	22.5	3.53553	8	1.41421	20	2.82843	8.5	2.12132	27	2.82843	20	0	7	0	7	0
24	L5-2-1	29.5	0.70711	21	1.41421	22	2.82843	22.5	2.12132	25	2.82843	15	0	22.5	3.53553	10	1.41421	24	1.41421	17.5	0.70711	7	0	7	0
25	L5-2-2	26.5	2.12132	19	1.41421	15	11.3137	8.5	2.12132	10.5	3.53553	8.5	0.70711	20	0	14.5	0.70711	9.5	0.70711	12	2.82843	14	8.48528	10	1.4142
26	L5-3-3	31.5	2.12132	23.5	2.12132	23.5	4.94975	19.5	0.70711	22.5	3.53553	8	1.41421	20	2.82843	8.5	2.12132	27	2.82843	20	0	7	0	7	0
27	L6-2-1	25	0	20	0	27.5	3.53553	17.5	3.53553	27	2.82843	15.5	0.70711	26	2.82843	12.5	3.53553	27	1.41421	21.5	2.12132	12.5	3.53553	7	0
28	L6-2-2	19	1.41421	21	1.41421	30	1.41421	8.5	0.70711	12.5	0.70711	9.5	0.70711	22.5	0.70711	7	0	11	1.41421	17	0	7	0	7	0
29	L6-3-3	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	9	1.41421	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0
30	L6-1-4	NO HUBO CRECIMIENTO																							

Donde:

\bar{x} = es el promedio del duplicado en mm

S= desviación estándar