

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“EFECTO ANTAGÓNICO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
AISLADAS DE TOCOSH SOBRE *Listeria innocua*”**

Presentada por:

MOISÉS RICARDO SALCEDO MARCELO

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2021

**La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“EFECTO ANTAGÓNICO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
AISLADAS DE TOCOSH SOBRE *Listeria innocua*”**

Presentada por:

MOISÉS RICARDO SALCEDO MARCELO

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Ph. D. Gretty Katherina Villena Chávez
PRESIDENTE

Dra. Carmen Velezmoro Sánchez
MIEMBRO

Dr. Ernesto Ormeño Orrillo
MIEMBRO

Dra. Doris Elizabeth Zúñiga Dávila
ASESORA

*A mi madre, Juana Guillermina Marcelo Quispe
que en vida me brindó amor y su incondicional
perseverancia para poder cumplir mis sueños.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Doris Zúñiga Dávila, mi patrocinadora, que me permitió desarrollar esta investigación en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabuso” , por su empuje y consejos en el desarrollo de este trabajo. Gracias por la

confianza y por darme la oportunidad de descubrir este inmenso mundo de la investigación.

Al proyecto N°223-FINCyT-IA-2013: “Valoración de la diversidad de microorganismos importantes en el proceso de Fermentación de productos tradicionales derivados de papa para la caracterización de Metabolitos con potencial aplicación biotecnológica” por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta investigación.

A mi padre, mi hermano y hermana por respetar y valorar mi trabajo, por la paciencia, por sus consejos y siempre darme apoyo. A mi esposa, mi amiga, mi amor Lucero Canales por acompañarme junto a nuestra hija Sophia en mis cansancios y en mis felicidades de mi trabajo.

A mis amigos del laboratorio “Marino Tabusso” , porque con ellos compartí muchos momentos gratos desarrollando mi tesis, Diego, Martín, Claudia, Jesús, Alexandra, Moniquita, Lily, Yohana, Mariela, y en especial a Ricardo y Lucero ya que compartimos tiempo, enseñanzas, buenos consejos, momentos divertidos y el compañerismo que nos unió como el grupo “Tunta”.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
1.1. TOCOSH	4
1.1.1. Procesamiento de tocosh de papa.....	5
1.1.2. Composición química de tocosh.....	7
1.1.3. Composición microbiológica de tocosh.....	8
1.2. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	9
1.2.1. Taxonomía de las Bacterias Ácido Lácticas.	10
1.2.2. Metabolismo de bacterias ácido lácticas	11
1.2.3. Sustancias antagónicas producidos por las BAL.....	13
1.3. MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN ALIMENTOS.....	19
1.3.1. Género <i>Listeria</i>	20
1.3.2. Taxonomía.....	20
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
3.1 MATERIALES	23
3.1.1 Material Biológico.....	23
3.1.2 Materiales y equipos de laboratorio	23
3.2 MÉTODOS.....	25
3.2.1 Lugar de ejecución	25
3.2.2 Aislamiento de bacterias ácido lácticas	25
3.2.3 Conservación de las bacterias aisladas por congelación a – 80 °C	25
3.2.4 Identificación de los aislamientos mediante pruebas bioquímicas.....	25
3.2.5 Actividad antagónica de cepas BAL contra <i>L. innocua</i>	27
3.2.6 Caracterización fisiológica de BAL con actividad antagónica frente a <i>L. innocua</i>	27

3.2.7	Caracterización de sustancias antagónicas contra <i>L. innocua</i>	28
3.2.8	Cuantificación de la actividad inhibitoria de sustancias antagónicas contra <i>L. innocua</i>	29
3.2.9	Cinética de crecimiento y producción de sustancias antimicrobianas	30
3.2.10	Caracterización molecular de las cepas BAL aisladas de tocosh que presentan antagonismo contra <i>L. innocua</i>	31
3.2.11	Análisis de datos	34
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1	Aislamiento de bacterias ácido lácticas de extractos de tocosh.....	35
4.2	Identificación de los aislamientos mediante pruebas bioquímicas.....	35
4.3	Actividad antagónica de cepas BAL contra <i>L. innocua</i>	37
4.4	Caracterización fisiológica	39
4.5	Caracterización de sustancias antagónicas contra <i>L. innocua</i>	42
4.5.1	Efecto de tratamiento con proteasas.....	44
4.5.2	Efecto del tratamiento térmico.....	46
4.5.3	Cuantificación de la actividad inhibitoria de sustancias antagónicas contra <i>L. innocua</i>	50
4.6	Cinética de crecimiento y producción de sustancias antagónicas	52
4.7	Caracterización molecular de las cepas BAL aisladas de tocosh que presentan antagonismo contra <i>L. innocua</i>	55
4.7.1	Amplificación PCR-BOX:.....	55
4.7.2	Amplificación y secuenciamiento del gen 16S del ARNr.....	55
IV.	CONCLUSIONES	59
VI.	RECOMENDACIONES.....	61
VII.	BIBLIOGRAFÍA	62
VIII.	ANEXOS.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Análisis químico-bromatológico de la papa de la variedad Revolución y del Tocosh.	7
Tabla 2: Diversidad de BAL aisladas provenientes de extractos de tocosh según su morfología.....	37
Tabla 3: Actividad antagonica de los SLC de las cepas 2TH03-BL12, 2TH03-BL13 y controles bacteriocinogénicos <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> frente a <i>L. innocua</i>	44
Tabla 4: Efecto de diversas proteasas en la actividad antagonica de los SLC las cepas 2TP03-BL12, 2TP03-BL13 y controles bacteriocinogénicos <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> frente a <i>L. innocua</i>	46
Tabla 5: Efecto del tratamiento térmico a diferentes temperaturas en la actividad antagonica de los SLC las cepas 2TP03-BL12, 2TP03-BL13 y controles bacteriocinogénicos <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> frente a <i>L. innocua</i>	49
Tabla 6: Actividades inhibitorias de sustancias antagonicas en los SLC de 2TH03-BL12, 2TH03-BL13 y controles bacteriocinogénicos <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> frente a <i>L. innocua</i> por efecto de enzimas, pH y tratamiento térmico.....	50
Tabla 7: Caracterización molecular de las cepas BAL aisladas de tocosh con capacidad antagonica frente a <i>L. innocua</i>	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Producción tradicional de tocosh, comunidad de Tambogán (Huánuco, Perú) . (A) Pozo en el suelo excavado cerca de un manantial de agua donde las papas se colocan entre las capas de paja y costal; (B) Papas retiradas de un pozo después de 8 meses de almacenamiento - tocosh.	5
Figura 2: Diagrama de flujo del proceso de elaboración de tocosh (Ccapa 2017).....	6
Figura 3: Identificación de poblaciones bacterianas en papas frescas (cero meses) y tocosh de pozos de almacenamiento de 1 y 8 meses excavados cerca de un manantial de agua. Se muestra la abundancia relativa (%) de familias (A), géneros (B) y géneros BAL (C).	9
Figura 4: Taxonomía de las bacterias ácido lácticas (Sauer et al. 2017).....	11
Figura 5: Principales rutas metabólicas de fermentación de azúcares por bacterias ácido lácticas (Gänzle 2015).	13
Figura 6: Producción de peróxido de hidrógeno por las bacterias ácido lácticas (Moreira 1993).	15
Figura 7: Tinción simple de una colonia aislada presuntiva como BAL al microscopio óptico. 1000X	35
Figura 8: Proporción de bacterias ácido lácticas aisladas de tocosh según su Morfología.....	36
Figura 9: Actividad antagónica de cepas BAL contra <i>L. innocua</i> . (A) BAL que no presentaron actividad antagónica. (B) Dos BAL presentan actividad antagónica. (C) Controles bacteriocinogénicos <i>L. lactis</i> (LL), <i>L. plantarum</i> (LP) presentando actividad antagónica.	38
Figura 10: Dinámica de Crecimiento de 2TH03-BL12 en caldo MRS a 28 °C. Curva de crecimiento (); pH (); las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).....	40

Figura 11: Dinámica de Crecimiento de 2TH03-BL13 en caldo MRS a 28 °C. Curva de crecimiento (); pH (); las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).....	41
Figura 12: Actividad antagónica de los SLC de las cepas 2TH03-BL12 (12), 2TH03-BL13 (13) y controles bacteriocinogénicos <i>L. lactis</i> (LL), <i>L. plantarum</i> (LP), <i>L. curvatus</i> (LC) frente a <i>L. innocua</i> . (A) Control, (SLC). (B) SLC neutralizado. (C) SLC neutralizado y sometido a la acción de catalasa.	43
Figura 13: Efecto de diversas proteasas en la actividad antagónica de los SLC de las cepas 2TP03-BL12 (12), 2TP03-BL13 (13) y controles bacteriocinogénicos <i>L. lactis</i> (LL), <i>L. plantarum</i> (LP), <i>L. curvatus</i> (LC) frente a <i>L. innocua</i> . A. SLC neutralizado y sometido con proteinasa K. B. SLC neutralizado y sometido con proteinasa de <i>Streptomyces</i> . C. SLC neutralizado y sometido con α -quimiotripsina. D. SLC neutralizado y sometido con tripsina.	45
Figura 14: Efecto del tratamiento térmico a diferentes temperaturas en la actividad antagónica de las cepas 2TP03-BL12(12), 2TP03-BL13(13) y controles bacteriocinogénicos <i>L. lactis</i> (LL), <i>L. plantarum</i> (LP), <i>L. curvatus</i> (LC) frente a <i>L. innocua</i> . A. SLC neutralizado y sometido a 70°C durante 10 minutos. B. SLC neutralizado y sometido a 70°C durante 30 minutos. C. SLC neutralizado y sometido a 70°C durante 50. D. SLC neutralizado y sometido a 100 °C durante 10 minutos.	48
Figura 15: Dinámica de crecimiento y producción de una sustancia tipo bacteriocina de 2TH03-BL12 en caldo MRS a 28 °C. Curva de crecimiento (); diámetro de halo de inhibición (); las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).....	52
Figura 16: Dinámica de crecimiento y producción de una sustancia tipo bacteriocina de 2TH03-BL13 en caldo MRS a 28 °C. Curva de	

crecimiento (); diámetro de halo de inhibición (); las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).....	54
Figura 17: Perfiles PCR-BOX de las cepas 2TH03-BL12 (12) y 2TH03-BL13 (13). B: blanco, M: Marcador 1Kb.	55
Figura 18: Electroforesis del gen 16S rRNA de dos cepas seleccionadas. B: blanco, M: Marcador 1Kb.	56

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: A1. Medio de cultivo MRS.....	80
Anexo 2: A2. Medio de cultivo TSA.....	80
Anexo 3: A3. Medio de cultivo TSB.....	80
Anexo 4: B4. Pruebas bioquímicas y actividad antagónica de BAL aisladas provenientes de Tocosh frente a <i>L. innocua</i>	81
Anexo 5: B5. Caracterización fisiológica de 2TH03-BL12 y 2TH03-BL12 mediante dinámica de crecimiento en caldo MRS a 28 °C.	96
Anexo 6: B6. Calidad de extracción de ADN mediante Nanodrop.....	96
Anexo 7: C7. Calidad de ADN por electroforesis.....	97
Anexo 8: C8. Tinción simple.....	97
Anexo 9: C9. Observación microscópica 1000X de las cepas (A) 2TH03-BL12 Y (B) 2TH03-BL13. Presentando ambas forma bacilar y Gram positivas.	98
Anexo 10: C10. Ensayo en pozo dilución crítica. 1/1, 1/4, 1/16, 1/64.....	98
Anexo 11: C11. Proceso de obtención de sustancias antagónicas.....	99
Anexo 12: D12. ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa 2TH03-BL12 por ensayo	100
Anexo 13: D3. ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa 2TH03-BL13 por ensayo	101
Anexo 14: D4. ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa 2TH03-BL12 por temperatura	102
Anexo 15: D15. ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa 2TH03-BL13 por temperatura	103
Anexo 16: D6. ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa 2TH03-BL12 por proteasa	104
Anexo 17: D17. ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa 2TH03-BL13 por proteasa	106

Anexo 18: D18. ANOVA multifactorial - halo de inhibición de control, neutralizado y catalasa por cepa.....	107
Anexo 19: D19. ANOVA multifactorial - halo de inhibición temperatura por cepa.....	108
Anexo 20: D20. ANOVA simple - halo de inhibición de las cepas control (<i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> y <i>L. curvatus</i>) por ensayo	110

RESUMEN

El tocosh como producto fermentado obtenido tradicionalmente por una técnica de conservación andina y que tiene propiedades nutritivas y terapéuticas, aún es producido principalmente por las poblaciones en las regiones centrales del Perú (Ancash, Huánuco y Junín) y que además es fuente de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) con alto potencial biotecnológico. Las BAL son microorganismos de grado alimenticio y, por lo tanto, una buena alternativa a los productos químicos que se aplican en la conservación de alimentos. *Listeria monocytogenes* posee una estrecha relación genética con *Listeria innocua*, es por esto que *L. innocua* es una opción, para pruebas *in vitro*, como sustituto no patogénico de *L. monocytogenes*. Así, el presente trabajo tiene como objetivo determinar el efecto antagónico *in vitro* de las BAL aisladas de tocosh frente a *L. innocua*. Se realizó el aislamiento de las probables BAL de muestras de extracto de tocosh, provenientes del banco de muestras del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” de la Universidad Nacional Agraria la Molina a 28 °C en medio MRS. Estos fueron caracterizados bioquímica y morfológicamente obteniendo 435 colonias las cuales resultaron catalasa negativas, KOH negativas y Gram positivas, encontrándose una predominancia de forma bacilar con 75.4 % seguido de cocobacilo 17.47 % y coco 7.13 %. El sobrenadante libre de células de sólo dos cepas aisladas, 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13, presentaron efecto antagónico frente a *L. innocua*. Las sustancias antagónicas producidas por estas dos BAL son termoestables y sus actividades no se ven afectadas por la neutralización ni por la eliminación del efecto del H₂O₂ ($p > 0.05$), sin embargo, las actividades se ven afectadas por la presencia de proteasas como la proteinasa K, proteinasa de *Streptomyces*, α -quimiotripsina y tripsina ($p < 0.05$). Estas sustancias producidas por 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 alcanzan sus niveles máximos a las 12 y 48 horas de incubación a 28 °C en caldo MRS, respectivamente. Además, las dos cepas aisladas, 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13, presentaron una identidad del 98.15 % y 98.70 % a *Lactobacillus brevis* ATCC 14869^T respectivamente.

Palabras clave: tocosh, bacteria ácido láctica, antagonismo, *Listeria innocua*.

ABSTRACT

The “Tocosh” is a fermented product traditionally obtained by Andean conservation techniques that has nutritional and therapeutic properties. It is still produced mainly by populations in the central regions of Peru (Ancash, Huánuco and Junín) and it is also a source of Lactic acid bacteria (LAB) strains with high biotechnological potential. LABs are highly food graded microorganisms, and therefore, a good alternative to chemicals used in food preservation. *Listeria monocytogenes* has a close genetic relationship with *Listeria innocua*. Accordingly, *L. innocua* is an option for *in vitro* tests as a non-pathogenic substitute for *L. monocytogenes*. Thus, the present work aims to determine the *in vitro* antagonistic effect of BALs isolated from tocosh against *L. innocua*. The isolation of the probable LABs from tocosh extract samples was performed at 28 °C in MRS medium. These samples came from the "Marino Tabusso" Microbial Ecology and Biotechnology Laboratory from La Molina National Agrarian University sample bank. These LABs were biochemically and morphologically characterized obtaining 435 colonies which were catalase negative, KOH negative and Gram positive, finding a predominance of bacillary form with 75.4% followed by cocobacillus 17.47% and coconut 7.13%. The cell-free supernatant obtained by only two isolated strains, 2TH03-BL12 and 2TH03-BL13, showed an antagonistic effect against *L. innocua*. The antagonistic substances produced by these two LABs are thermostable and their activities are not affected by neutralization or elimination of the H₂O₂ effect ($p > 0.05$). However, the activities were affected by the presence of proteases such as proteinase K, *Streptomyces* proteinase, α -chymotrypsin and trypsin ($p < 0.05$). These substances produced by 2TH03-BL12 and 2TH03-BL13 reach their maximum levels at 12 and 48 hours of incubation at 28 °C in MRS broth, respectively. Furthermore, the two isolated strains, 2TH03-BL12 and 2TH03-BL13, presented a 98.15% and 98.70% of identity, respectively to *Lactobacillus brevis* ATCC 14869^T.

Key words: tocosh, lactic acid bacteria, antagonism, *Listeria innocua*.

I. INTRODUCCIÓN

En el transcurso de los años el hombre se organizó en asentamientos fijos y fue necesario almacenar alimentos en los periodos de abundancia que en épocas de escasez eran consumidos. La fermentación de la leche y otros alimentos contribuyeron a satisfacer este requerimiento (Martín 2008). Entre 1857 y 1863, Louis Pasteur estudió la fermentación ácido láctica y diez años más tarde Joseph Lister obtuvo el primer cultivo puro de una bacteria ácido láctica (Report 2006). Las bacterias ácido lácticas (BAL) están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos, tierra, plantas verdes, así como también del tracto digestivo y vagina de mamíferos, entre otras fuentes (Azadnia et al. 2011, Tomás et al. 2003).

Estos microorganismos naturalmente producen varias sustancias con un potencial antimicrobiano, tales como ácidos orgánicos, CO₂ y el peróxido de hidrógeno (Carr et al. 2002, Martinis et al. 2003). Algunas cepas BAL son capaces de producir bacteriocinas (Cotter et al. 2005, Riley y Wertz 2002) que son polipéptidos con actividad antimicrobiana específica contra un grupo de bacterias de la misma o diferente especie (Nes y Johnsborg 2004, Cotter et al. 2005).

El aumento en la demanda de productos que estén menos procesados y libres de prelevantes (Álvarez-León et al. 2006), ha estimulado cada vez más el uso de BAL o sus bacteriocinas para el control de ciertos patógenos, como es el caso de *Listeria monocytogenes*, que posibilitarían la biopreservación y extensión de la vida útil de los alimentos, entre otras aplicaciones (Gong et al. 2010, Holzappel 1995, Leroi et al. 2009, Huang et al. 2009, Durlu-Ozkaya et al. 2007).

Las BAL desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación y son ampliamente utilizados en los alimentos industriales como herramientas para la seguridad de la comida (Adams y Mitchell 2002, Leroy y De Vuyst 2004), ya que el uso de BAL y de sus productos metabólicos es Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS) para el consumo humano (Liu et al. 2011, Silva et al. 2002, Chen y Hoover 2003). Específicamente,

las bacteriocinas representan una atractiva opción para la industria de alimentos, debido a que no alteran el sabor o el olor de los productos finales (Nes y Johnsborg 2004).

La enfermedad causada por especies de *Listeria* se conoce como listeriosis (Vázquez-Boland et al. 2001). *Listeria monocytogenes* ha surgido como un patógeno importante transmitido por los alimentos (Farber y Peterkin 1991) que causa enfermedad grave en los lactantes, mujeres embarazadas, ancianos y personas inmunocomprometidas, que van desde la septicemia, meningitis, encefalitis, y el aborto hasta la muerte ocasional (Liu et al. 2007).

Entre numerosos factores, el antagonismo microbiano parece jugar un papel importante en el destino de *L. monocytogenes* en los alimentos (Aguilar et al. 2010, Leverentz et al. 2006, De Carvalho et al. 2006). Otra especie de *Listeria*, *Listeria innocua*, no lleva los mismos genes asociados con la virulencia como *L. monocytogenes*, además de ser no patógeno, *L. innocua* es fisiológicamente cercana a *L. monocytogenes*, y ambos pueden ocurrir en los mismos productos alimenticios (Cornu et al. 2002). La presencia de *L. innocua* se considera un indicador de la presencia de *L. monocytogenes* debido a su frecuente contaminación de los alimentos, en los que por lo general crece más y enmascara la presencia de *L. monocytogenes* (Liu et al. 2003, Perrin et al. 2003, Curiale y Lewus 1994).

El tocosh, cuya palabra deriva del vocablo “togosh” palabra quechua que significa arrugado y fermentado, es el resultado de la fermentación bacteriana de productos andinos como la papa (Naupari et al. 1993). Tocosh se ha preparado desde hace cientos de años transcurridos desde la época inca en América del Sur y todavía se está preparando en muchas pequeñas comunidades en Perú como en Ancash, Huánuco y Junín (Ray y Montet 2014). Además se ha determinado la presencia de bacterias ácido lácticas durante la etapa de la inmersión de los tubérculos en las fuentes de agua y también se han reportado bacterias del género *Lactobacillus* en altas concentraciones al final del proceso de fermentación, así mismo, se le atribuye propiedades alimenticias y curativas, como antimicrobiano y de reforzamiento del sistema inmunológico (Prentice y Milka 2005, García et al. 2005).

Social y económicamente, el uso de agentes antimicrobianos posibilitaría la biopreservación y extensión de la vida útil de productos alimenticios, propiciando una mayor producción para el mercado interno y externo mejorando la calidad del producto. Además, dada la tendencia al aumento de las importaciones de productos naturales y de alimentos con propiedades funcionales en países europeos (Durlu-Ozkaya et al. 2007), redundaría en un

incremento de la producción de las exportaciones, en la mejora económica de los productores y por ende en su nivel de vida.

Por tanto, el presente estudio tiene como objetivo determinar el efecto antagónico *in vitro* de las BAL aisladas de producto fermentados andinos derivados de papa: tocosh frente a *Listeria innocua*.

Objetivos específicos:

- Caracterizar fisiológicamente las bacterias ácido lácticas aisladas de tocosh.
- Determinar el efecto antagónico *in vitro* de las cepas caracterizadas como BAL frente a *Listeria innocua*.
- Caracterizar molecularmente las cepas BAL que presentan antagonismo contra *Listeria innocua*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. TOCOSH

El tocosh o t'úqush (quechua) de papa es un producto alimenticio fermentado ancestral que los campesinos locales todavía preparan en pequeñas comunidades de las tierras altas de los Andes centrales peruanos (Jiménez et al. 2018). Se obtiene al fermentar la papa fresca bajo una corriente de agua proveniente de un manantial o acequia a 2.500 – 4.400 m.s.n.m., durante más de 4 meses dependiendo de la variedad que se fermente (Zvietcovich 1985). Durante el procesamiento del tocosh se realiza una reducción de la celulosa por acción bacteriana, dejando en libertad al almidón y desarrollándose esteroides, adquiriendo un olor bastante fuerte y distintivo como producto de la fermentación (Naupari et al. 1993). Se sabe que el tocosh es un alimento artesanal que contiene penicilina natural sintetizada por poblaciones de *Penicillium* sp., y es conocido como el preservante del cuerpo que fortalece el sistema inmunológico, suministrándole diversa flora probiótica, además de bactericida (Orihuela 1991).

En la actualidad Perú tiene tres regiones productoras de tocosh, las cuales son: Ancash, Huánuco y Junín debido a la gran producción y variedad de papas en la sierra central del Perú. Se encuentra diferencia en la consistencia y sabor del tocosh según sea norte, centro y sur del Perú, siendo, la segunda, de mejor calidad por las condiciones climáticas óptimas para su preparación (Díaz y Delgado 2012). Para el procesamiento del tocosh, se utilizan diferentes variedades de papa que contienen una gran cantidad de glicoalcaloides que son solubles en agua y que le otorgan a la papa el sabor amargo. Las variedades silvestres más usadas para la elaboración del tocosh son: shiri, rukki, cusi, puckoya, ayanhui, chaquilla, huaña y muñi (Bravo 1991).

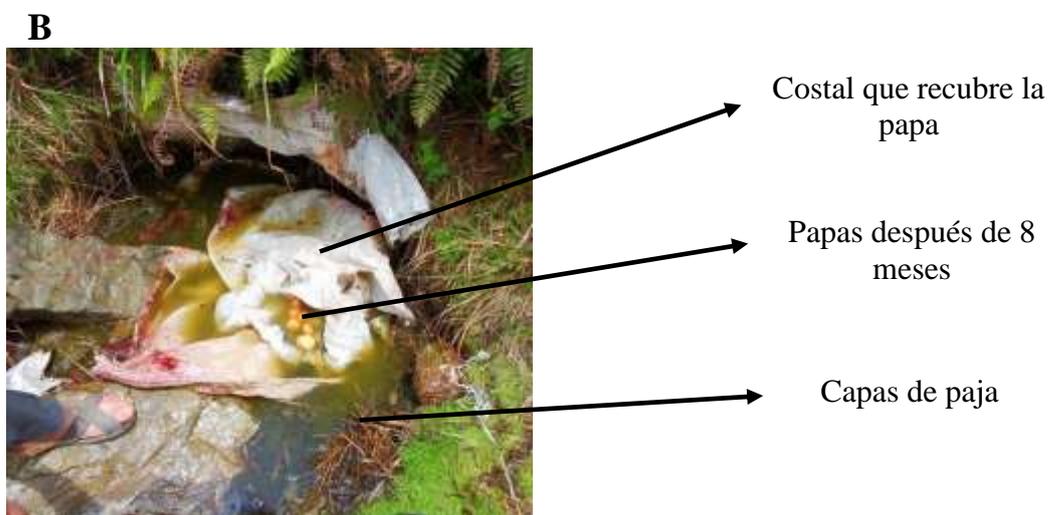
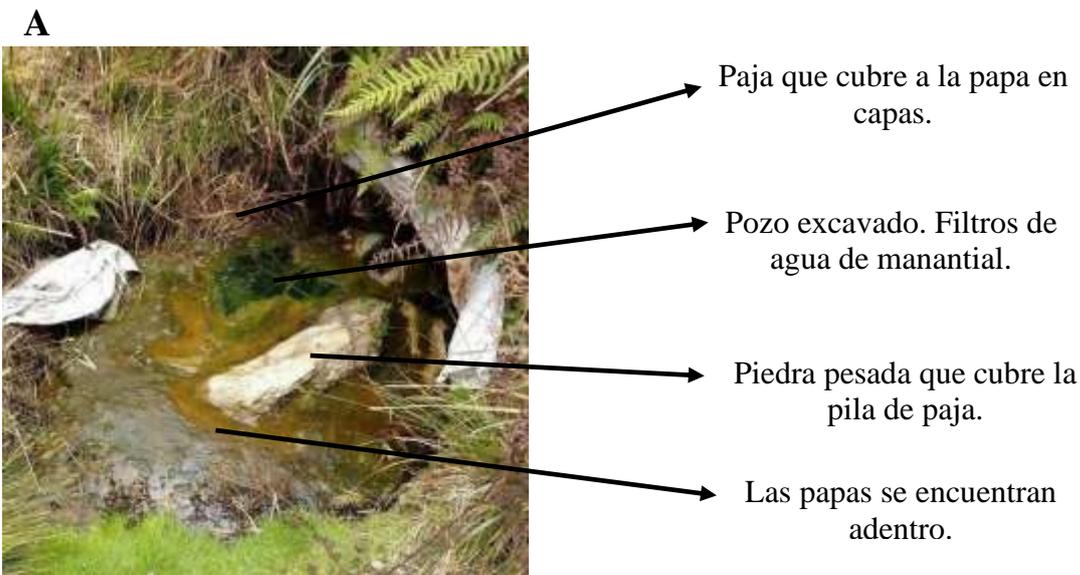


Figura 1: Producción tradicional de tocosh, comunidad de Tambogán (Huánuco, Perú) . (A) Pozo en el suelo excavado cerca de un manantial de agua donde las papas se colocan entre las capas de paja y costal; (B) Papas retiradas de un pozo después de 8 meses de almacenamiento - tocosh.

1.1.1. Procesamiento de tocosh de papa

Después de la cosecha de papa, especialmente de las variedades Huayro, Iskupuru y Blanca se hace la selección de la papa que servirá para su elaboración; se usa la del descarte, la más amarga o tubérculos dañados. Es frecuente en Ancash (tocosh) y Puno (anaphusa); se practica con algunas variantes en muchas otras partes de la Sierra, como en Huánuco y Cerro de Pasco (Gonzales De La Cruz et al. 2014, Vilca Renojo 2015).

El método de preparación tradicional consiste en cavar un pozo (0,70 x 1,50 m de profundidad) en el suelo cerca de un manantial o acequia, con temperaturas que fluctúan entre 5 a 16 °C, en el que se colocan grandes cantidades de papas (normalmente papas de

descarte) entre las capas de paja llamada “shicshi”; también se puede usar la misma acequia que se acomoda con paja que se trae de la altura, la paja debe estar muy tupida y apelmazada. Entre la paja se coloca la papa que debe estar muy escondida y protegida (Jiménez et al. 2018). Se usan costales y rocas pesadas para cubrir la pila con el fin de evitar que los tubérculos sean arrastrados por la leve corriente de agua que atraviesa la zanja (Andina 2010); las papas se dejan fermentar en esta agua corriente hasta 12 meses. Después de este tiempo, las papas sufren un pardeamiento enzimático (Zvitov-Ya’ari y Nussinovitch 2014). Pasado este tiempo se saca del pozo y se coloca en un área seca y sombreada para permitir que el agua drene; se deja allí por tres días. Ya seco se sacan las papas fermentadas (tocosh) y se colocan en un nuevo paquete de shicshi, este producto obtenido se conserva para consumo, venta o, más comúnmente, como un producto de harina fina molida y secada al sol que se utiliza para preparar diferentes caldos, guisos y "mazamorra", que es un alimento semi-líquido con consistencia espesa (Vilca Renojo 2015, Jiménez et al. 2018).

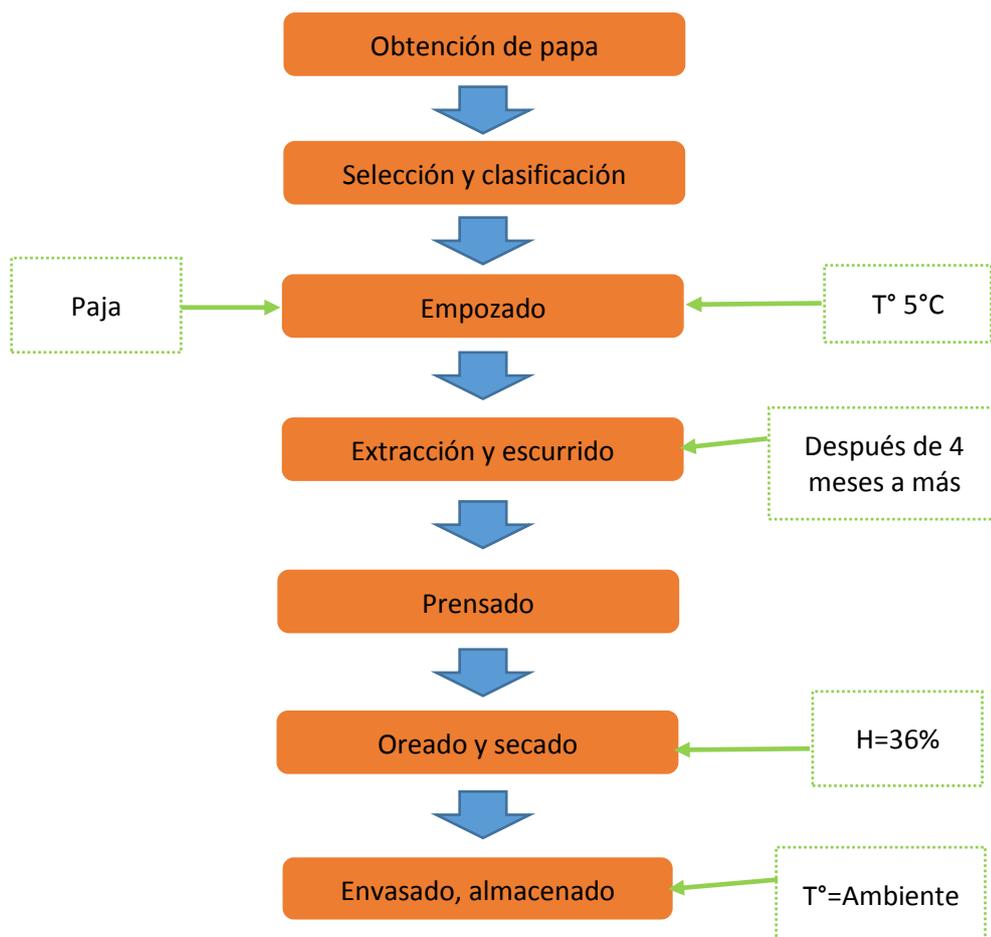


Figura 2: Diagrama de flujo del proceso de elaboración de tocosh (Ccapa 2017).

1.1.2. Composición química de tocosh

La composición química-bromatológica del tocosh es diferente al de la papa (Tabla 1). La capacidad de captación de agua en el tocosh es mayor, los lípidos también se incrementan debido posiblemente a su concentración en el producto, lo más diferencial es la disminución de las proteínas totales y el incremento de los carbohidratos, ello podría atribuirse a la hidrólisis que se produce en el proceso. Los carbohidratos en el tocosh se incrementan principalmente por la concentración de almidón. En el proceso realizado, de sumersión de la papa en el agua por un largo periodo y a baja temperatura, el aumento del almidón podría deberse a la hidrólisis de los polisacáridos no alminodosos y a la conversión de los azucares a almidón (Naupari et al. 1993).

La Sociedad Química del Perú, refiere que a partir de la papa (*Solanum tuberosum*), el tocosh procesado por fermentación a pH: 5-6 y temperatura 12 °C, obtiene un color blanco crema, sabor ácido, un olor a fermentación característica y textura semidura. Bromatológicamente contiene un elevado nivel de carbohidratos (80%), menor cantidad de proteínas (3.91%) y un alto nivel calórico (343.42kcal) (Belitz et al. 2009).

Tabla 1: Análisis químico-bromatológico de la papa de la variedad Revolución y del Tocosh.

Análisis	Papa		Papa de Tocosh	
	Muestra seca (g %)	Muestra fresca (g %)	Muestra seca (g %)	Muestra fresca (g %)
Agua	10.34	77.92	12.69	79.66
Residuo seco	89.66	22.08	87.31	20.34
Lípidos	0.56	0.12	0.86	0.17
Proteínas totales	10.84	2.39	3.91	0.79
Cenizas	3.82	0.84	1.37	0.28
Fibra	1.61	0.35	1.16	0.24
Almidón	68.19	15.06	77.13	15.69
Azúc. Reductores directos	0.51	0.11	0.79	0.16
Azúc. Reductores totales	0.8	0.18	0.9	0.18
Nitrógeno Amínico	0.28	0.06	0.31	0.06
Acidez (%H₂SO₄)	1.41	0.31	0.3	0.26
Calorias (Cal)	339.72	84.16	343.42	80.13

FUENTE: Naupari et al. 1993.

1.1.3. Composición microbiológica de tocosh

Desde el punto de vista microbiológico, solo se han realizado estudios preliminares que demuestran que el tocosh resulta de la fermentación microbiana, principalmente por *Lactobacillus* (Jiménez et al. 2018). Asimismo, en el proceso de fermentación de dicho tubérculo se encontró la participación de bacterias aeróbicas esporuladas (*Bacillus*) a partir del 4to al 16vo día. Entre el día 16 y 20, se incrementó el número de *Lactobacillus* manteniéndose constante hasta los 30 días, bacterias que serían responsables de la producción de gases. Las levaduras son escasas al inicio, se presentan entre los 8 a 12 días aumentando posteriormente en similar proporción que los *Lactobacillus* hacia el final del proceso, ya elaborado el tocosh refleja baja digestibilidad, pero amplio valor biológico (Álvarez et al. 2011).

Además de ser un alimento básico importante para la población local, se cree que los compuestos generados por estos microorganismos son beneficiosos, aunque no se encontraron estudios que respalden estas afirmaciones, se demostró su potencial probiótico utilizando un modelo animal experimental y se comparó con una cepa probiótica reconocida de *Lactobacillus acidophilus* (Prentice y Milka, 2005). Ya que las bacterias ácido lácticas generalmente están involucradas en alimentos fermentados tradicionalmente de origen vegetal y muchas especies de estas han sido descritas como productoras de vitaminas, bacteriocinas o degradadores de fitatos, pueden ser responsables de la gran diversidad de propiedades medicinales atribuidas a este producto como tal, conocido como el "antibiótico natural de los incas" (Yépez et al. 2017, Jiménez et al. 2018).

Recientemente, se han analizado productos alimenticios andinos fermentados tradicionalmente como "tocosh" de las tierras altas de los Andes centrales peruanos determinando sus poblaciones bacterianas (Figura 3) (Jiménez et al. 2018).

Según las figuras la proporción de bacterias ácido lácticas es menor en relación a otros grupos como *Clostridiaceae*.

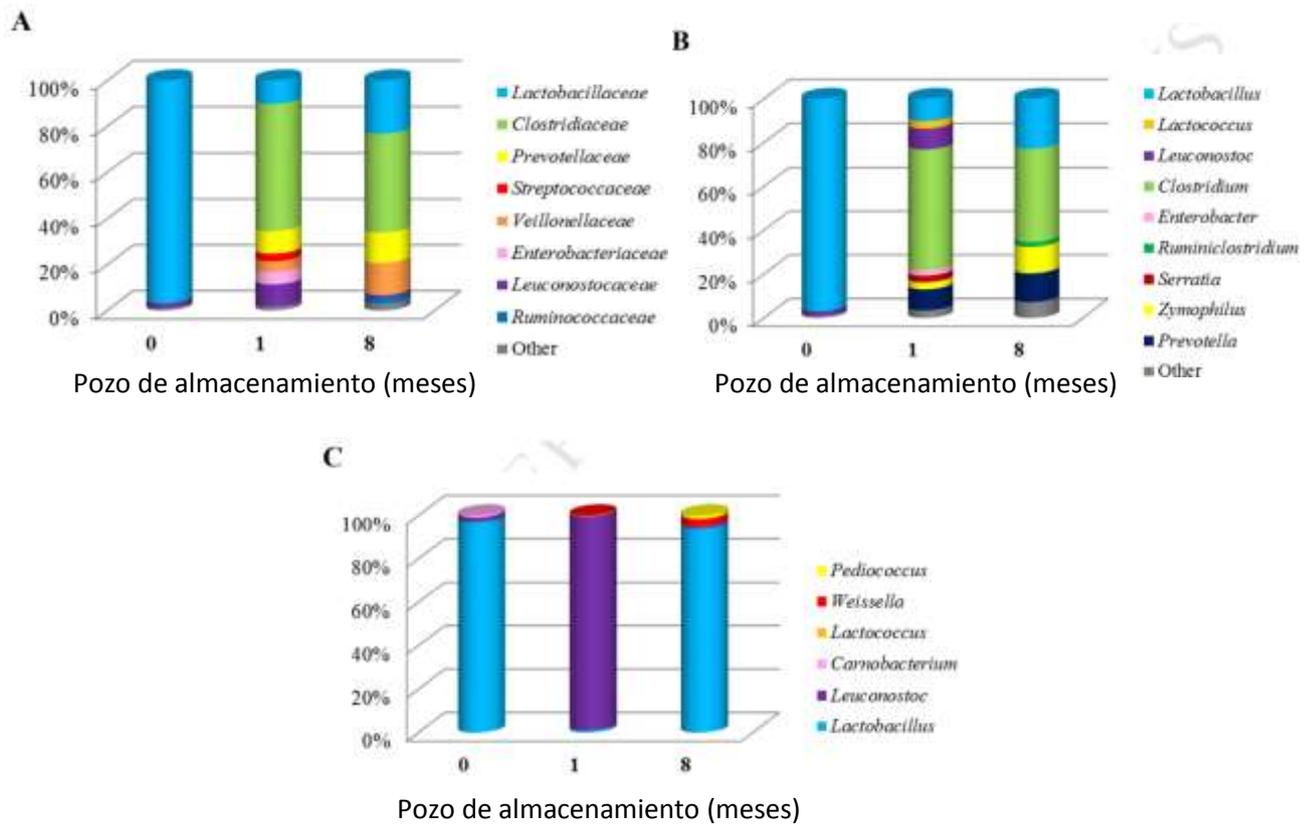


Figura 3: Identificación de poblaciones bacterianas en papas frescas (cero meses) y tocosh de pozos de almacenamiento de 1 y 8 meses excavados cerca de un manantial de agua. Se muestra la abundancia relativa (%) de familias (A), géneros (B) y géneros BAL (C).

1.2. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Este grupo de bacterias están presentes en la alimentación del hombre desde hace mucho tiempo y es posible encontrarlas en diferentes productos debido a la capacidad que poseen de crecer en una variedad de sustratos y en diversas condiciones biológicas (Del Campo et al. 2008). Se encuentran en sustratos de origen animal de un pH neutro, así como en los de elevada acidez como son, normalmente, los de origen vegetal. También se encuentran bacterias lácticas en ambientes de elevadas temperaturas y de altas concentraciones de cloruro sódico; su adaptación a estas dos últimas condiciones puede deberse a la necesidad del hombre de conservar sus alimentos. Afortunadamente, estas bacterias producen ácido láctico como producto final de su metabolismo, que este además de no ser tóxico para el hombre y de poseer un sabor agradable, influye en el pH del medio reduciéndolo e impidiendo así el desarrollo de microorganismos perjudiciales (Moreira 1993, Agudelo et al. 2015).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bajo contenido de G + C, inferior al 50 %, formado de cocos y bacilos Gram positivos, estas bacterias no móviles se caracterizan por su capacidad para fermentar el azúcar en ácido láctico (Thokchom y Joshi 2012). No forman esporas, están desprovistos de citocromos, son anaerobios en la naturaleza, pero pueden tolerar el aire, son catalasa negativos (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn 2010, Thokchom y Joshi 2012). Pueden crecer a temperaturas de 5-45 °C y la condición de pH óptimo es 5.5-6.5. Estas bacterias tienen requerimientos nutricionales complejos que incluyen aminoácidos, péptidos, bases de nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos (Vodnar et al. 2010).

1.2.1. Taxonomía de las Bacterias Ácido Lácticas.

La clasificación de las bacterias ácido lácticas en diferentes géneros está basada en la morfología, modo de fermentar la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad para crecer a elevadas concentraciones de sales y la tolerancia ácido-base. La descripción general de este grupo de bacterias se incluye en el grupo de Gram-positivos, no esporulados, cocos o bacilos que producen ácido láctico como producto principal de la fermentación de carbohidratos (Ramírez Ledezma 2010).

Los límites de este grupo han sido objeto de controversia, pero históricamente los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *Streptococcus* forman el corazón del grupo. Las revisiones taxonómicas de este grupo y la descripción de nuevos géneros sugieren que las bacterias ácido lácticas se componen de un número de géneros bacterianos dentro del phylum Firmicutes, donde se incluye a los siguientes géneros: *Carnobacterium*, *Alloiococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Ercolini et al. 2001, Carr et al. 2002, Holzapfel et al. 2001, Thokchom y Joshi 2012). Sin embargo, a partir del 2017 el orden de los *Lactobacillales* comprende seis familias (Sauer et al. 2017). Cada familia consta de varios géneros, de los cuales solo se muestran los más conocidos y solo se ilustra una selección de especies (Figura 4).

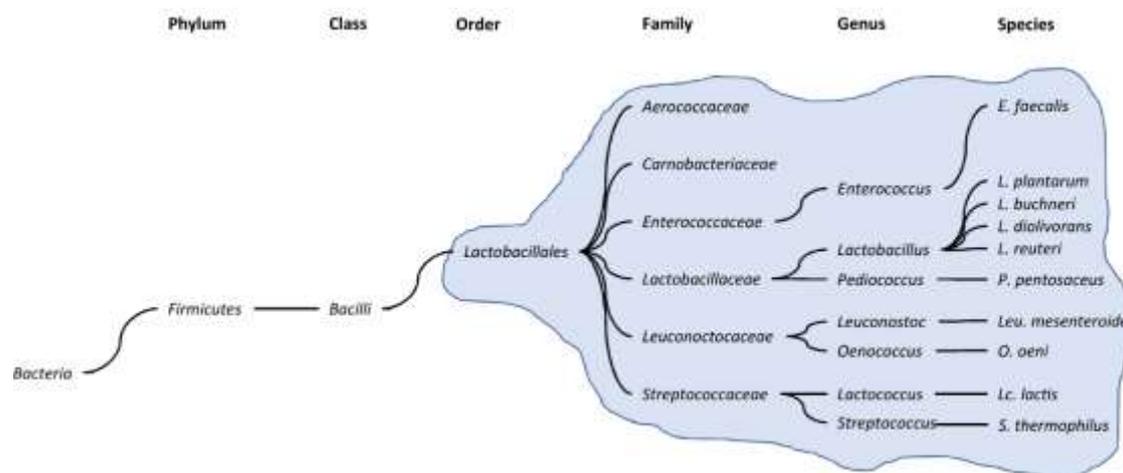


Figura 4: Taxonomía de las bacterias ácido lácticas (Sauer et al. 2017).

1.2.2. Metabolismo de bacterias ácido lácticas

Los principales carbohidratos existentes en la mayoría de los vegetales son glucosa, fructosa y sacarosa. Las pentosas libres no suelen estar presentes en cantidades suficientes como para ser importantes en las fermentaciones. Las BAL involucradas en las fermentaciones de vegetales, aunque consisten en varios géneros diversos, se pueden dividir también en dos grupos fisiológicos, dependiendo de su vía de fermentación de hexosa siguiendo principalmente dos rutas importantes: homofermentativa y heterofermentativa. Las homofermentativas degradan las hexosas a través de la glucólisis, y producen ácido láctico como el principal producto final, mientras que las BAL heterofermentativas utilizan la vía de las pentosas fosfato produciendo ácido láctico, CO₂, ácido acético y/o etanol (Blandino et al. 2003). También puede producir otros productos finales, dependiendo de la especie y las condiciones de crecimiento (Condon 1987, Kandler 1983, Gänzle 2015).

A. Homofermentativas

Las bacterias ácido lácticas homofermentativas u homolácticas (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y algunas especies de *Lactobacillus*) poseen la enzima aldolasa y pueden fermentar azúcares por la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) de piruvato, que es convertido en ácido láctico, casi exclusivamente como producto final, por la lactato deshidrogenasa (Mozzi et al. 2010). Se producen dos moles de ATP por mol de hexosa fermentada y no hay producción neta de poder reductor ya que el NADH producido en la transformación de la triosafosfato a piruvato se consume posteriormente en la reducción del piruvato a lactato. Sin embargo, hay homofermentativas obligadas y facultativas. Estas últimas tienen glucosa-6-P-deshidrogenasa y siguen la vía de las pentosas. El que utilicen

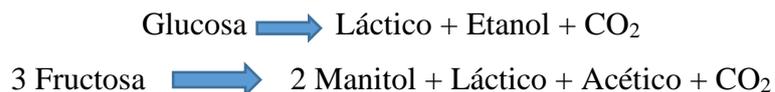
una u otra vía, alternativa o simultánea, depende de las condiciones de cultivo (Parés y Juárez 2002, Gänzle 2015). La reacción global se puede resumir como:



B. Heterofermentativas

Bacterias ácido lácticas heterofermentativas o heterolácticas tales como *Leuconostoc*, *Oenococcus* y ciertas especies de *Lactobacillus*, al carecer de la enzima aldolasa, fermentan azúcar en general por la vía fosfocetolasa (PKP) (Mozzi et al. 2010). Producen solamente 50% de ácido láctico. Estas fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂. 1 mol de ATP es generada por mol de glucosa. También difiere de la glucólisis en que se originan 3 mol de NADH. Para recuperar el equilibrio redox, 1 mol se oxida en la etapa de reducción del piruvato y, si no existen aceptores de electrones alternativos, el acetilfosfato se reduce a etanol oxidándose las otras dos moles de NADH; si existen aceptores alternativos se forma ácido acético como producto final. La fructosa también puede ser metabolizada a través de la ruta heterofermentativa de forma análoga a la glucosa, pero también puede funcionar como un aceptor de electrones adecuado llevando a cabo la oxidación del NADH; como resultado, una gran parte de la fructosa se reduce a manitol (Devlieghere et al. 2004, Gänzle 2015).

Se tienen ahora las siguientes reacciones globales:



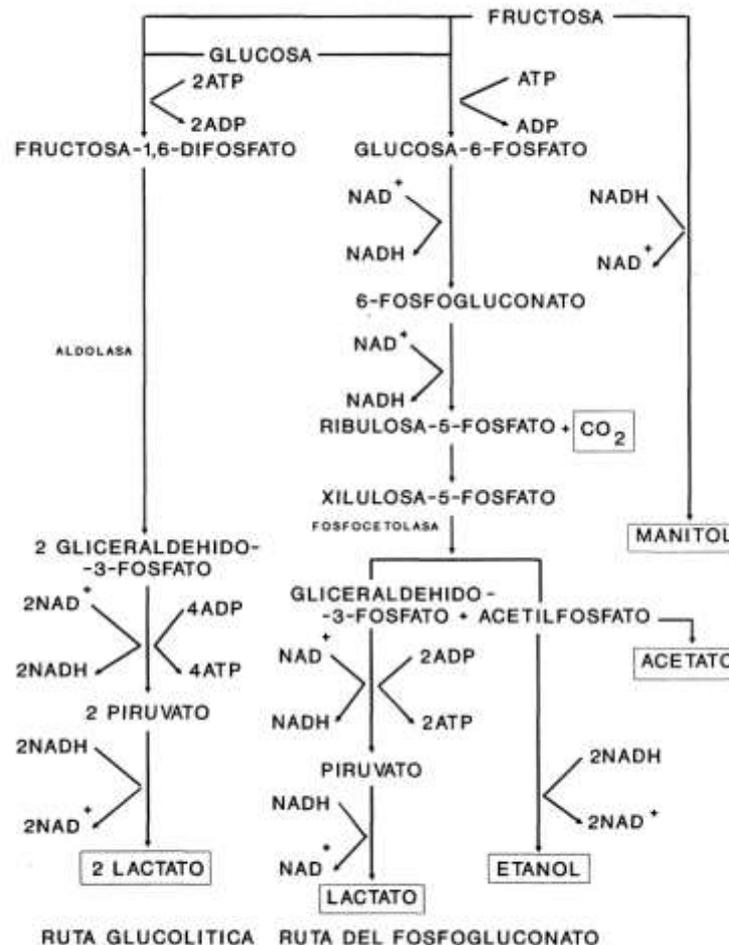


Figura 5: Principales rutas metabólicas de fermentación de azúcares por bacterias ácido lácticas (Gänzle 2015).

1.2.3. Sustancias antagonistas producidos por las BAL

La utilización de los carbohidratos disponibles en el alimento y la reducción del pH a causa de los ácidos orgánicos producidos, son el principal mecanismo de antagonismo microbiano de las bacterias ácido lácticas. No obstante, estas bacterias también producen un conjunto de otras sustancias antagonistas dentro de las cuales se destacan el peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, acetoína, reuterina, reuterociclina, péptidos antifúngicos y bacteriocinas) (Banaay et al. 2013), que han sido utilizados como biopreservadores en productos alimenticios, con el objetivo de evitar la proliferación de patógenos como por ejemplo *Listeria monocytogenes* (Durlu-Ozkaya et al. 2007).

A. Ácidos orgánicos

Los niveles y tipos de ácidos orgánicos, tales como ácido láctico, acético y propiónico (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn 2010), producidos durante el proceso de

fermentación dependen de la especie de organismo, composición de cultivo y condiciones de crecimiento (Lindgren y Dobrogosz 1990, Yang 2000). La fermentación de azúcar, seguido por una reducción en el pH debido a la producción de ácido láctico y otros ácidos orgánicos es un factor importante para la inhibición de crecimiento de microorganismos no deseados (Ruiz Rodríguez et al. 2017, Djadouni y Kihal 2012).

El ácido láctico es producido por la vía homofermentativa de las BAL como el principal metabolito a través de la vía EMP. Aunque también, por la vía heterofermentativa se produce en menores cantidades. Puede interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas. El grado de disociación del ácido láctico depende del pH, donde un bajo pH se encuentra en la forma no disociada, siendo tóxico para hongos, levaduras y varias bacterias. En la actividad antimicrobiana, los esteroisómeros del ácido láctico difieren, de forma que el ácido L-láctico es más inhibitorio que el isómero D-láctico (Ouwehand 2004, Yang 2000).

El ácido acético y propiónico son producidos por las cepas de BAL por la vía heterofermentativa, pueden interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas. Estos compuestos antimicrobianos son más efectivos que el ácido láctico debido a los elevados valores de pKa (ácido láctico 3.08, ácido propiónico 4.87 y ácido acético 4.75), por lo tanto tienen un mayor rango de actividad antimicrobiana contra levaduras, mohos y bacterias (Yang 2000). El ácido acético es el más efectivo contra el crecimiento de *Listeria monocytogenes* que el ácido láctico. El ácido acético tiene una actividad sinérgica con el ácido láctico; el pH del medio disminuye por la acción del ácido láctico, aumentando la toxicidad del ácido acético (Ouwehand 2004; Sánchez 2003).

B. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es producido en presencia de oxígeno como mecanismo de protección por las BAL a través de la acción de flavoproteína oxidasa o NADH peroxidasa (Dahl et al. 1989, Condon 1987). Las fermentaciones con producción de ácido láctico son esencialmente reacciones anaeróbicas por lo que la formación de peróxido de hidrógeno será limitada por la cantidad de oxígeno disuelto en el sustrato al iniciarse la fermentación. Su efecto antimicrobiano se debe a la oxidación de los grupos sulfhidrilo causando la desnaturalización de enzimas, y de la peroxidación de las membranas lipídicas, aumentando la permeabilidad de la membrana. El H_2O_2 puede ser un precursor para la producción de

radicales libres como son el superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH^-) los cuales dañan el ADN (Adams y Moss 2007, Yang 2000).

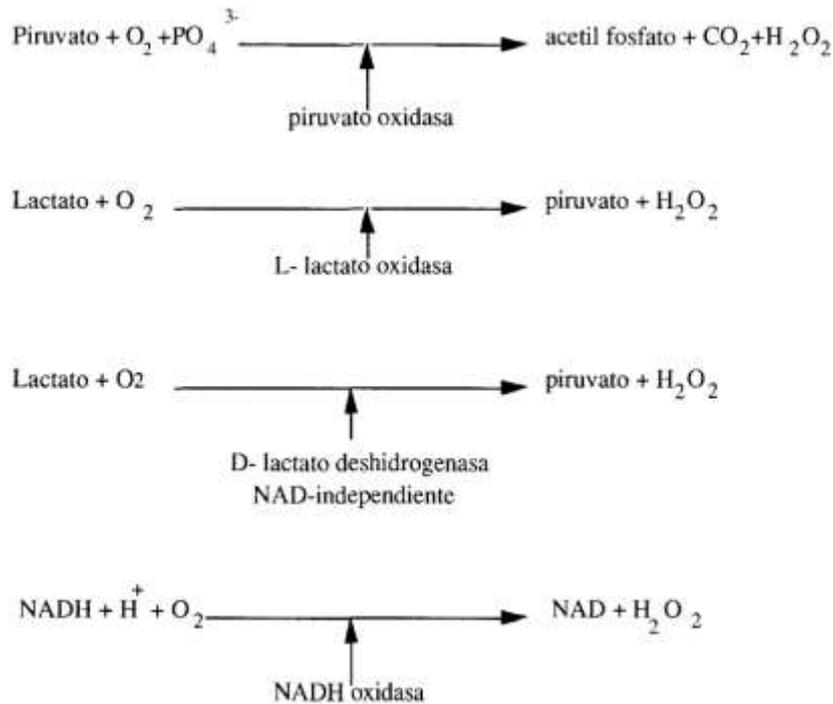


Figura 6: Producción de peróxido de hidrógeno por las bacterias ácido lácticas (Moreira 1993).

C. Dióxido de carbono

El dióxido de carbono (CO_2) es producido principalmente por la vía heterofermentativa de las BAL. Aún se desconoce el mecanismo de acción antimicrobiana del CO_2 , sin embargo, puede crear un ambiente anaerobio el cual inhibe las descarboxilaciones enzimáticas, y la acumulación de CO_2 en la bicapa lipídica de la membrana causando una disfunción en la permeabilidad. A bajas concentraciones el CO_2 puede estimular el crecimiento de algunos organismos mientras que a una alta concentración puede prevenir el crecimiento de microorganismos deterioradores de alimentos. El grado de inhibición por CO_2 varía considerablemente entre los organismos. El CO_2 a concentración del 10% puede disminuir las cuentas bacterianas totales hasta un 50% y a concentraciones de 20-50% tiene una fuerte actividad antifúngica (Ouweland 2004, Yang 2000).

D. Compuestos aromáticos

El diacetilo o 2,3-butanodiona es el producto final de la fermentación del citrato producido por *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Hugenholtz 1993, Vandenberg 1993). El efecto antimicrobiano del diacetilo se conoce desde 1930, tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias Gram negativas impidiendo el uso de arginina y de ser bacteriostático para bacterias Gram positivas (Ouweland 2004), debido al grupo α , α -dicarbonil de la molécula, que reacciona con la porción guanido del aminoácido arginina de las enzimas microbianas, desactivándolas por bloqueo o modificación de la zona catalítica (Lindgren y Dobrogosz 1990).

El diacetilo a 344 $\mu\text{g/mL}$ puede inhibir cepas de *Listeria*. Dado que la producción de diacetilo durante la fermentación láctica es baja y los niveles sensoriales aceptables son de 2-7 $\mu\text{g/mL}$, esto limita su uso como conservador en alimentos. Sin embargo, el diacetilo puede actuar sinérgicamente con otros factores antimicrobianos y contribuir a los sistemas combinados de conservación en los alimentos fermentados (Ouweland 2004, Yang 2000).

El acetaldehído es producido por cepas de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* mediante la acción de una treonina aldolasa la cual transforma la treonina en acetaldehído y glicina. Debido a que el *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* presentes en el yogurt no pueden metabolizar el acetaldehído, éste se acumula en el producto aumentando la concentración a 25 ppm. A una concentración entre 10-100 ppm el acetaldehído inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* en productos lácteos (Sánchez 2003).

E. Reuterina

Entre los compuestos no protéicos que producen las BAL durante su crecimiento se encuentra la reuterina. Esta sustancia sólo se produce por *Lactobacillus reuteri*, aislado del tracto gastrointestinal de personas y animales; su potencial tóxico aún no se ha evaluado, aunque por su naturaleza existen dudas acerca de su posible utilidad en la industria alimentaria. Su actividad antimicrobiana es extraordinariamente amplia, afectando a bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras, mohos y protozoos. La reuterina se forma durante la utilización anaerobia del glicerol e inhibe la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa involucrada en la síntesis del ADN, lo que determina su amplio espectro antimicrobiano (Yang 2000).

F. Bacteriocinas

Las bacteriocinas se pueden definir como péptidos antimicrobianos generalmente de 3-10 kDa, estables al calentamiento, tienen un punto isoeléctrico alto, de naturaleza anfipática catiónicas, ya que contienen un exceso de residuos de lisina y arginina o, en algunos casos hidrofóbica y su capacidad para interactuar con la membrana plasmática de las células sensibles (Rodríguez et al. 2000, 2003, Criado et al. 2006). Además, las bacteriocinas se sintetizan ribosómicamente y se someten a modificación postraduccional produciéndose durante la fase primaria de crecimiento bacteriano (Beasley y Saris 2004, Rodríguez et al. 2000, 2003).

En general, las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram positivas, tales como las BAL presentan un amplio espectro antimicrobiano que afecta incluso a géneros taxonómicos no relacionados con una acción bactericida o bacteriostática contra algunas especies bacterianas (Nes et al. 2007, Jack et al. 1995). El extenso conocimiento sobre muchas de las bacteriocinas provenientes de las BAL y junto al estatus que generalmente se les considera como seguros, las hace ser consideradas como biopreservantes y seguras para el consumo humano, además pueden degradarse fácilmente por enzimas proteolíticas, especialmente por las proteasas del tracto gastrointestinal de mamífero (Xie et al. 2011, Rodríguez et al. 2000, 2003).

A pesar que las bacteriocinas de las BAL difieren en su espectro de actividad y en determinantes bioquímicos y genéticos, algunas características comunes permiten dividir las en cuatro clases, basadas en estructura primaria, peso molecular, estabilidad térmica y organización molecular (Riley y Chavan 2006, Cotter et al. 2005).

- **Clase I (lantibióticos):**

Es una clase de sustancias peptídicas modificadas postraduccionalmente que contienen los tioéter-aminoácidos policíclicos característicos lantionina o metillantionina, así como los aminoácidos insaturados dehidroalanina y ácido 2-aminoisobutírico. Además, se desarrollan en dos tipos basados en similitudes estructurales. Péptidos lineales (tipo A) comprende moléculas flexibles anfipáticas, relativamente alargadas, con forma de tornillo, cargadas positivamente. Su masa molecular varía entre 2 a 4 kDa y actúan generalmente a través de la formación de poros, a través de la despolarización de la membrana, de la membrana citoplasmática de la especie diana sensible, la nisina y la lacticina son los principales representantes de este grupo (Ghraiiri et al. 2012). Y

globulares (tipo B), interfieren con las reacciones enzimáticas celulares. Su masa molecular está entre 2 y 3 kDa y no tienen carga neta ni carga neta negativa (Cintas et al. 2001, Deegan et al. 2005, Drider et al. 2006).

Las bacteriocinas BAL de clase I son pequeños péptidos estables al calor (<5 kDa), que se modifican extensamente después de la traducción, dando lugar a la formación de los aminoácidos tioéter característicos lantionina (Lan) y β -metilantionina (MeLan). Estos surgen después de un proceso de dos pasos. En primer lugar, la codificación de los genes serina y treonina pueden someterse a deshidratación enzimática para dar lugar a deshidroalanina (Dha) y deshidrobutirina (Dhb). Posteriormente, los grupos tiol de las cisteínas vecinas atacan el doble enlace de Dha y Dhb produciendo Lan y MeLan, respectivamente. Esta condensación entre dos residuos vecinos da lugar a la formación de anillos covalentemente cerrados dentro del péptido anteriormente lineal que confiere estructura y funcionalidad. También los miembros de este grupo contienen D-alanina. Este último residuo de aminoácido se deriva de deshidroalanina resultante de la deshidratación de un residuo de serina (Chen y Hoover 2003, Rodríguez et al. 2000, 2003).

- **Clase II (no lantibióticos):**

Compuesto de péptidos termoestables (<10 kDa, con aproximadamente 37 a 48 aminoácidos) que son péptidos activos de membrana que no contienen lantionina. Se dividen en tres subclases (Drider et al. 2006) conocidas como:

- **subclase IIa**, de tipo pediocina o de bacterias activas contra *Listeria* spp., poseen una secuencia consenso N-terminal Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys. Ellos muestran un alto grado de homología (40 % -60 %) cuando las correspondientes secuencias de aminoácidos están alineadas. Se sintetizan con un péptido líder que se elimina mediante procesamiento proteolítico, usualmente después de un residuo doble de glicina por ejemplo como la pediocina PA-1, Sakacina A (Patton y Donk 2005).
- **subclase IIb**, se refiere a bacteriocinas de dos componentes (dos péptidos separados) que requieren la unión de dos péptidos para trabajar sinérgicamente con el fin de tener por completo una actividad antimicrobiana óptima. Lactacina F y lactococina G son miembros de este grupo (Daw y Falkiner 1997).
- **subclase IIc**, se agrupan en función de su característica estructural única de una ciclización cabeza a cola de sus cadenas principales (Gabrielsen et al. 2014, Belkum

et al. 2011). La naturaleza circular de su estructura proporciona mayor estabilidad estructural, mayor resistencia al estrés térmico y una estabilidad superior frente a la digestión proteolítica, en comparación con sus péptidos lineales (Perez et al. 2014). Se han identificado numerosas bacteriocinas circulares, incluyendo enterocina AS-48, gassericina A, uberolisina, carnociclina A, lactociclina Q, garvicina ML, leucociclina Q y acidocina B (Acedo et al. 2015).

- **Clase III:**

Se compone de proteínas lábiles al calor de alto peso molecular (> 30 kDa). Este grupo no ha sido investigado. Ampliamente las bacteriocinas que representan este grupo son la helveticina J, la acidofilucina A y las lactaínas A y B (Riley y Chavan 2006).

- **Clase IV:**

Compuesto de bacteriocinas complejas que contienen restos de carbohidratos o lípidos, además de la porción de proteína (Riley y Chavan 2006). Sin embargo, se propuso que estos complejos son artefactos de purificación parcial y no una nueva clase de bacteriocinas (Cleveland et al. 2001).

1.3. MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN ALIMENTOS

En los alimentos ocasionalmente se encuentran microorganismos patógenos para el hombre y los animales, muchos de estos alimentos presentan alto riesgo por sus características fisicoquímicas (pH cercano a la neutralidad, actividad de agua alta, y alto contenido de proteínas y grasa) lo que permite que en su superficie se contamine con diversos microorganismos, incluidos patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (MINSAs 2019). El consumo de estos microorganismos viables y en número suficiente en el alimento, seguido del crecimiento del mismo por la invasión de los tejidos puede ocasionar un proceso infeccioso en la que los microorganismos no necesariamente se multiplican en el alimento, sino que el alimento sólo actúa como vehículo, siendo este el caso para bacterias, virus y parásitos que se multiplican e invaden el intestino ocasionando enfermedades como shigelosis, listeriosis, gastroenteritis, fiebre tifoidea, disentería bacilar, hepatitis A y amibiasis. O bien por la ingestión de una toxina ya presente en el alimento contaminado, las toxinas generadas en el alimento pueden estar asociadas a las células microbianas o pueden ser liberadas de ellas. También puede originarse una toxi-infección que es producida por la ingestión de alimentos con agentes

patógenos que al multiplicarse en el intestino producen toxinas o sustancias tóxicas, en este tipo de enfermedades se incluyen las especies de *Clostridium perfringes*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae* (Centurión y Takajara 2004, Orsi y Wiedmann 2016).

1.3.1. Género *Listeria*

Listeria spp. se caracterizan por ser bacterias Gram positivas de forma bacilar, no esporuladas, de 1.2 x 0.5 µm, a veces cocoide y corineforme por mostrar diploformas dispuestas en “V”; las células también aparecen aisladas. Son anaerobios facultativos, móviles con flagelos peritricos. Presentan movilidad entre 20-25 °C, pero no a 37 °C. Son organismos psicrotrofos, capaces de crecer a temperaturas de refrigeración, su crecimiento óptimo es de 30 a 37 °C, pero puede crecer en un rango de 4 a 40 °C. El crecimiento de las cepas es inhibido a valores de pH inferiores a 5.5 pero el pH mínimo de crecimiento se encuentra entre 4.4 y 5.6 (Frazier y Westhoff 2000).

1.3.2. Taxonomía

Actualmente el género *Listeria* incluye 17 especies reconocidas (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, y *L. booriae*), de las cuales solamente dos (*L. monocytogenes* y *L. ivanovii*) son consideradas patógenas (Orsi y Wiedmann 2016).

Se sugiere la organización del género *Listeria* en dos categorías que son: *Listeria sensu strictu* que incluye *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, y *L. innocua*, y *Listeria sensu lato* que incluye las otras 11 especies de las cuales ninguna se describe como patógena (Edy et al. 2015, Orsi y Wiedmann 2016). A continuación, se muestra su clasificación taxonómica:

Reino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Listeriaceae

Género: *Listeria*

A. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un patógeno alimentario común que se encuentra en la naturaleza. Puede encontrarse en plantas, suelo o agua, y se ha aislado de muchos mamíferos y especies de aves. *Listeria monocytogenes* es un bacilo corto, Gram-positivo, con motilidad de extremo a extremo a temperatura ambiente (Brooks et al. 2013). Es un anaerobio facultativo positivo a la catalasa, oxidasa negativa, con ligera β -hemólisis en agar sangre. Se sabe que *Listeria monocytogenes* sobrevive a la refrigeración, congelación, calentamiento y secado, lo que crea obstáculos para la industria alimentaria. Tiene un crecimiento óptimo a 32-35 ° C, pero puede sobrevivir y multiplicarse a temperaturas de refrigeración. Se ha encontrado en alimentos crudos, tales como frutas, verduras y carnes crudas, y se ha asociado con brotes en leche cruda, helados, carnes crudas y productos de carne y queso listos para comer (CFSAN 2003).

Esta bacteria intracelular *Listeria monocytogenes* es causante de la listeriosis en una gran variedad de especies. Este patógeno puede resistir temperaturas de congelación, infectando al hombre principalmente por la vía digestiva, por lo que es un agente causante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). La bacteria expresa su patogenicidad cuando enfrenta huéspedes con deficiencia de inmunidad, especialmente de tipo celular. Esta condición se observa mayormente en grupos considerados de alto riesgo, como los niños, ancianos, individuos inmunosuprimidos y mujeres gestantes (Vázquez-Boland et al. 2001). La listeriosis humana tiene una alta tasa de mortalidad, llegando hasta 34 %, y es en la actualidad una de las ETA de mayor importancia en el mundo (Edy et al. 2015).

B. *Listeria innocua*

Listeria innocua, estrechamente relacionada con *Listeria monocytogenes*, es una cepa bacteriana Gram-positiva, bacilo corto, no forma esporas, es catalasa positiva, oxidasa negativa, y anaerobia facultativa (Brooks et al. 2013). La diferencia aparente entre las especies es la falta de patogenicidad de *L. innocua*. A diferencia de *L. monocytogenes*, *L. innocua* no produce β -hemólisis en agar sangre (Poysky et al. 1993), esta característica ha sido una de las pocas pruebas disponibles para la diferenciación de especies de *Listeria*. Otra diferencia es la presencia de arilamidasa en *L. innocua*, donde *L. monocytogenes* no contiene esta sustancia (Bille et al. 1992). *L. innocua* en sí no plantea actualmente un problema de salud alimentaria para los consumidores. Sin embargo, la presencia de *L. innocua* indica el potencial para la contaminación de *L. monocytogenes*, que es una gran preocupación para los consumidores y procesadores. La similitud entre estas especies dificulta la distinción

entre ellas, por otro lado *L. innocua* es una opción atractiva como sustituto, para pruebas *in vitro*, de *L. monocytogenes* debido a su estrecha relación genética (Milillo et al. 2013).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Material Biológico

A. Microorganismos: *Lactobacillus plantarum* CRL 69, *Lactococcus lactis* CRL 1109, *Lactobacillus curvatus* CRL 169, *Listeria innocua* 7, *Escherichia coli* ATCC 25922, muestra de extracto de tocosh en medio caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) crio preservadas en el cepario del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” de la UNALM.

3.1.2 Materiales y equipos de laboratorio

A. Medio de cultivo

- Medio agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Rogosa et al. 1951).
- Medio caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS).
- Medio caldo tripton de soya (TSB) enriquecido con 0.5% de extracto de levadura (Anexo 3: A3).
- Medio agar tripton de soya (TSA) blando (0.7% de agar) enriquecido con 0.5% de extracto de levadura (Anexo 2: A2).
- Medio agar tripton de soya (TSA) enriquecido con 0.5% de extracto de levadura (Anexo 2: A2).

B. Soluciones y reactivos

- Glicerol (99% de pureza)
- Solución de KOH al 3%
- Solución de H₂O₂ al 3%
- Cristal violeta
- Aceite de inmersión
- Solución NaOH 2N
- Solución de Catalasa de hígado de bovino (1000 U/ml)
- Proteinasa K de *Tritirachium album* (Sigma-Aldrich) (1600 U/ml).

- Proteinasa de *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich) (1600 U/ml).
- α -Quimiotripsina de páncreas bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (1600 U/ml).
- Tripsina de páncreas bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (1600 U/ml).
- Agua MilliQ
- Buffer de PCR + KCl 10X
- Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 100%
- Tampón de carga 6X
- Cloruro de magnesio MgCl₂ 25 mM
- Solución de dNTPs 25 mM
- Solución de 100 pmol/ μ l del cebador BOX A1R
- Solución de 10 pmol/ μ l de los cebadores rD1 y fD1
- *Taq* polimerasa 5 unidades

C. Equipos y materiales de Laboratorio

- Asas de Kölle
- Agitador mecánico orbital (MRC)
- Autoclave horizontal (Barnstead)
- Balanza analítica (Sartorius)
- Cámara de electroforesis (Cleaver Scientific Ltd)
- Cámara fotográfica digital (Panasonic).
- Congeladora de -20 °C (Whirlpool)
- Congeladora de -80 °C (Sanyo)
- Equipo de Baño María (Mettler)
- Espectrofotómetro (Genesys 6 – Thermo Electron Corp.)
- Fotodocumentador de geles de electroforesis (Cleaver Scientific Ltd).
- Kit de extracción de ADN (AxyPrep)
- Matraces Erlenmeyer
- Mechero Bunsen
- Microcentrífuga (Sigma)
- Micropipeta automática (Nichipet EX)
- Microscopio (Leica DM750)
- Placas Petri desechables 90x15"

- Potenciómetro (Hanna Instruments pH 211)
- Refrigeradoras (Bosch)
- Termociclador convencional (Eppendorf)
- Vórtex (Gemmy UM-300).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Lugar de ejecución

Todos los ensayos experimentales se realizaron en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” de la UNALM.

3.2.2 Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Se descongelaron crioviales conteniendo muestras de extracto de tocosh, provenientes del banco de muestras del Laboratorio de Ecología y Biotecnología “Marino Tabusso” de la Universidad Nacional Agraria la Molina, de -80 °C hasta temperatura ambiente y después se procedió a homogenizar la muestra en el vortex. En presencia del mechero con el asa de Kölle se extrajo una película de muestra y se procedió al aislamiento mediante la técnica de agotamiento por estrías en agar MRS. Se dejó incubar a 28 °C por un periodo de 48 horas (Paitán et al. 2019).

Después de las 48 horas se extrajo una colonia de la placa con agar MRS y se sembró en placas Petri con medio agar MRS por estrías en paralelo y se incubó por 24 horas a 28 °C, se procedió a tomar muestra de una colonia aislada y seguidamente sembrarlo en 3 ml de caldo MRS por 24 horas a 28°C (Paitán et al. 2019).

3.2.3 Conservación de las bacterias aisladas por congelación a – 80 °C

Se tomó una alícuota de 1000 µL del caldo de cultivo fresco con las cepas a guardar (crecidos previamente a 28°C durante 24 horas) y se dispensó en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se adicionó 500 µL de glicerol (30% v/v). Las cepas se guardaron por duplicado en cajas criogénicas y se almacenaron en congeladora a -80 °C (Soda et al. 2003).

3.2.4 Identificación de los aislamientos mediante pruebas bioquímicas

Se descongelaron las cepas de bacterias aisladas de -80 °C hasta temperatura ambiente y después se procedió a homogenizar la muestra en el vortex. En presencia del mechero con el asa de Kölle se extrajo una película de muestra y se procedió al aislamiento mediante agotamiento por estrías en agar de MRS. Se dejó incubar a 28 °C por un periodo de 48 horas.

Después de las 48 horas se extrajo una colonia de la placa con agar MRS y se sembró en 3 ml de caldo MRS para incubarlo por 24 horas a 28 °C. Las colonias presuntivas como BAL se verificaron por medio de las pruebas de KOH, catalasa y tinción simple (Sharpe 1979, Öz et al. 2017).

A. Prueba de KOH

Se preparó solución de KOH al 3%, con el gotero se adicionó un par de gotas de solución KOH a la placa Petri vacía y estéril. En presencia del mechero con el asa de Kölle se extrajo una colonia ya aislada y se procedió a frotar la colonia aislada con las gotas de KOH en la placa Petri. Si al separar el asa de la mezcla se forma una hebra viscosa, la prueba es positiva e indica que se trata de bacterias Gram negativas y si al separar el asa no se forma una hebra viscosa, la prueba es negativa, e indica que las bacterias son Gram positivas. Se realizó un control positivo con *E. coli* ATCC 25922 (KOH positiva) para observar la diferencia entre ambas (Gregersen 1978, Öz et al. 2017).

B. Prueba de catalasa

Se preparó solución de H₂O₂ al 3%, con el gotero se adicionó un par de gotas de solución H₂O₂ a la placa Petri vacía y estéril. En presencia del mechero con el asa de Kölle se extrajo una colonia ya aislada y se procede a frotar la colonia aislada con las gotas de H₂O₂ en la placa Petri, el desprendimiento de burbujas se considera una prueba positiva e indica que se trata de bacterias catalasa positivas y si no hay desprendimiento de burbujas, la prueba es negativa, e indica bacterias catalasa negativas. Se realizó un control positivo con *E. coli* ATCC 25922 (catalasa positiva) para observar la diferencia entre ambas (Naidu et al. 1999, Öz et al. 2017).

C. Tinción simple

Por último, se adicionó una gota de agua destilada sobre el portaobjeto, luego en presencia del mechero con ayuda del asa de Kölle se extrajo una colonia ya aislada y se procedió a mezclar la colonia aislada con la gota de agua sobre el portaobjeto. Se fijó la muestra pasándola rápidamente a la llama del mechero. Se adicionó cristal violeta y se dejó por un minuto, luego se enjuagó con agua destilada y se secó con papel toalla. Y, para terminar, se adicionó aceite de inmersión y se observó al microscopio para determinar su morfología (Vázquez et al. 2011).

3.2.5 Actividad antagónica de cepas BAL contra *L. innocua*

Para este ensayo, se usó la técnica gota sobre la superficie (*spot-on-lawn*), que consiste en aplicar 5 µL del sobrenadante de los cultivos de BAL sobre la superficie seca del medio semisólido TSA (Gratia 1946) y se utilizaron como controles positivos las cepas de *L. plantarum* CRL 69 y *L. lactis* CRL 1109 que son microorganismos bacteriocinogénicos de referencia. *L. innocua* será la cepa sensible, teniendo en cuenta que *L. innocua* es un sustituto no patogénico de *L. monocytogenes* (Vaz-velho et al. 2001, Milillo et al. 2012).

Se tomó 30 µL de *L. innocua* (60% transmitancia; aproximadamente 10⁶ UFC/mL) previamente incubada en 3 ml de TSB enriquecido con 0.5% de extracto de levadura a 30 °C por 24 horas, y se colocó en un tubo conteniendo 10 mL de TSA blando (0.7% de agar) enriquecido con 0.5% de extracto de levadura. Seguidamente se dispensó el contenido del tubo en una placa Petri estéril y se dejó solidificar en condiciones de esterilidad. Luego se centrifugaron los cultivos a 8000 rpm durante 5 minutos, previamente incubados en 3 ml de caldo MRS a 28 °C por 24 horas, de las cepas control positivas y las BAL aisladas. Se eliminó el pellet celular del sobrenadante y se adicionó 5 µL del sobrenadante a la placa Petri estéril que contiene el medio TSA blando con *L. innocua*. Se incubó a 30 °C por 24 horas para observar la formación de halos de inhibición en las áreas de aplicación del sobrenadante (Milillo et al. 2013, Reenen et al. 1998, Koo et al. 2012, Kuttner 1966).

3.2.6 Caracterización fisiológica de BAL con actividad antagónica frente a *L. innocua*

Se tomó una asada asépticamente de la cepa en placa crecida por 24 horas a 28 °C luego se resuspende en un matraz de 125 mL con 50 mL de caldo MRS. Se incubó a 28 °C durante 12 horas en un shaker a 100 rpm. Se repitió lo anterior, es decir, se realizó un pase de preinóculo a inóculo, tomando 100 µl del caldo bacteriano crecido anteriormente durante 12 horas a 50 mL de caldo MRS estéril, incubándolo a 28 °C durante 12 horas a 100 rpm. En un matraz de 250 mL se colocó 135 mL de caldo MRS (10 g/L de glucosa), se inoculó hasta obtener un valor inicial de densidad óptica de 0.1 a 600 nm y un volumen final de 140 mL. Finalmente se incubó a 28 °C durante 48 h en agitación constante a 100 rpm (Rodríguez, et al., 2012).

A. Recuento en placa

Para monitorear el cambio en el recuento (UFC/ml) como función del tiempo, se tomaron muestras a las: 0, 2, 6, 9, 12, 17, 24, 48 y 99 horas. En cada tiempo se tomaron un total tres muestras provenientes de cada uno de los matraces usados (tres matraces). Asépticamente 1

mL de muestra con ayuda de una micropipeta se colocó en un tubo con 9 mL de solución salina, previamente autoclavada, se homogenizó el tubo utilizando un vortex, este tubo representa la dilución 10^{-1} , luego se realizó el mismo procedimiento, es decir diluciones seriadas. En el tiempo cero del muestreo se realizó hasta la dilución 10^{-5} , mientras que para los siguientes puntos de muestreo se realizó la dilución hasta 10^{-8} . Finalmente se tomaron las tres últimas diluciones realizadas y se colocó 1 mL de dilución en placas petri para luego añadir 15 mL de agar MRS a 45 °C aproximadamente. Se procedió a homogenizar el medio para distribuir uniformemente el inóculo, para luego incubar a 28 °C durante 48 h y contar el número de colonias para luego ser multiplicado por el factor de dilución y construir la curva de crecimiento.

B. Medición de pH

En paralelo se monitoreó el descenso de pH a las 0, 2, 6, 9, 12, 24, 48, 79 y 99 horas. Asépticamente 500 µL de muestra con ayuda de una micropipeta se coloca en un microtubo y se procedió a determinar el pH de las muestras con un potenciómetro por inmersión del electrodo previamente calibrado.

3.2.7 Caracterización de sustancias antagónicas contra *L. innocua*

Después de seleccionar las cepas BAL que presentaron inhibición contra *L. innocua*, se procedió a evaluar si las sustancias antagónicas producidas por las BAL son ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, además si son de naturaleza peptídica y termoresistentes.

Se inició con la incubación de las cepas BAL que presentaron inhibición contra *L. innocua* y las cepas control positivas (*L. plantarum* CRL 69, *L. lactis* CRL 1109 y *L. curvatus* CRL 169), a 28 °C en 10 ml de caldo MRS por 24 horas. Los caldos se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y todos los sobrenadantes obtenidos se esterilizaron con filtro de 0.22 µm para obtener sobrenadantes libres de células.

Para empezar, se eliminó el efecto de inhibición por ácidos orgánicos producidos por las BAL, neutralizando los sobrenadantes con NaOH 2N hasta pH 7.0 y se esterilizó a través de una membrana de 0.22 µm para obtener sobrenadantes neutralizados libres de células (Harris et al. 1989, Yaakoubi et al. 2009). Para continuar se eliminó el efecto de inhibición del peróxido de hidrogeno producido por las BAL, exponiendo a los sobrenadantes neutralizados libres de células a una solución de Catalasa (1000 U/ml) por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se incubó, para la inactivación de la enzima, a 30 minutos por 40 °C (Yaakoubi et al. 2009). Seguidamente se observó si la sustancia producida por las

BAL es de naturaleza peptídica, para esto se trató a los sobrenadantes libres de células, ya neutralizados y expuesto con catalasa, con cuatro proteasas diferentes, proteinasa K, proteinasa de *Streptomyces*, α -quimiotripsina y tripsina por 20 minutos (Benkerroum et al. 2000, Pringsulaka et al. 2012), con una concentración final de 1600 U/ml y luego se incubó a 1 hora por 40 °C.

Por último, se evaluó si la sustancia producida por las BAL es termoresistente, llevando a incubar los sobrenadantes neutralizados libres de células y expuestas a solución de Catalasa (1000 U/ml) a 70 °C a tres diferentes tiempos 10, 30 y 50 minutos; y a 100 °C por 10 minutos en una mini-incubadora para microtubos (Pringsulaka et al. 2012).

Repitiendo la técnica gota sobre la superficie (Gratia 1946) se aplicaron 5 μ L de los sobrenadantes filtrados libres de células neutralizados, expuestas a solución de catalasa, tratadas con las cuatro diferentes proteasas y a diferentes temperaturas sobre placas estériles, previamente dispensadas con 10 mL de TSA blando enriquecido con 0.5% de extracto de levadura conteniendo 30 μ L de *L. innocua* y se incubaron a 30 °C por 24 horas. Después de las 24 horas se observó las zonas claras donde no crece la cepa sensible (*L. innocua*), el medio se verá traslúcido a diferencia de los alrededores donde se podrá apreciar el crecimiento de la cepa sensible (Lindgren y Dobrogosz 1990).

3.2.8 Cuantificación de la actividad inhibitoria de sustancias antagónicas contra *L. innocua*

Para este ensayo, se usó la técnica de difusión en pozos para cuantificar, mediante el método de dilución crítica, la actividad de los sobrenadantes libres de células frente a la cepa sensible *L. innocua* (Pérez et al. 2016). Se inició con la incubación de las cepas BAL que presentaron inhibición contra *L. innocua* y las cepas control positivas (*L. plantarum* CRL 69, *L. lactis* CRL 1109 y *L. curvatus* CRL 169), a 28 °C en 10 ml de caldo MRS por 24 horas. Los caldos se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y todos los sobrenadantes obtenidos se esterilizaron con filtro de 0.22 μ m. Estos se llevaron a las siguientes condiciones: neutralizado (pH 7), adición de catalasa, con cuatro proteasas diferentes (proteinasa K, proteinasa de *Streptomyces*, α -quimiotripsina y tripsina), a temperaturas de 70 °C a tres diferentes tiempos 10, 30 y 50 minutos; y a 100 °C por 10 minutos como se describe en el procedimiento 3.2.7 y se realizaron diluciones de estas con agua desionizada estéril (1/1, 1/2, 1/4, 1/16, 1/64) (Botthoulath et al. 2018).

Se inocularon 45 μ L de *L. innocua* (60% Transmitancia) en tubos conteniendo 15 mL de medio TSA enriquecido con 0.5% de extracto de levadura. Se dispensaron en placas Petri estériles y se dejaron solidificar en condiciones de esterilidad durante una hora dentro de la cabina de flujo laminar. Posteriormente, con ayuda de un sacabocados se realizó perforaciones de 9 mm de diámetro en cada placa. A cada pozo, se le adicionó 40 μ l de cada uno de los sobrenadantes a diferentes condiciones. Todo el procedimiento fue realizado dentro de una cabina de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Se procedió a sellar las placas con cinta parafilm e incubarlas boca abajo durante 30 °C durante 24 horas.

La actividad se definió como el recíproco de la dilución más alta que muestra un halo de inhibición y se expresó en unidades arbitrarias (AU) por mililitro y se calculó con la fórmula $(1000 / 40) \times (1 / D)$, donde 40 es el volumen de la muestra utilizada en microlitros, y D es la dilución máxima que inhibió el crecimiento de la cepa sensible a las 24 horas de incubación (Farias et al. 1994, Botthoulath et al. 2018).

3.2.9 Cinética de crecimiento y producción de sustancias antimicrobianas

Se tomó una asada asépticamente de la BAL crecida en placa con 24 horas de anterioridad, luego se resuspendió en un matraz de 125 mL con 50 mL de caldo MRS. Se incubó a 28 °C durante 12 horas en un shaker a 100 rpm. Se repitió lo anterior, es decir, se realizó un pase de preinóculo a inóculo, tomando 100 μ l del caldo bacteriano crecido anteriormente durante 12 horas a 50 mL de caldo MRS estéril, incubándolo a 28 °C durante 12 horas a 100 rpm. En un matraz de 250 mL se colocó 135 mL de caldo MRS (10 g/L de glucosa), se inoculó hasta obtener un valor inicial de densidad óptica de 0.1 a 600 nm y un volumen final de 140 mL. Finalmente se incubó a 28 °C durante 48 horas en agitación a 100 rpm (Rodríguez, et al., 2012). Luego, se recuperaron alícuotas de 2 ml después de 0, 6, 12, 24 y 48.

Se sembraron las diluciones adecuadas en agar MRS, incubando a 28 °C por 24 horas y se realizó el conteo celular, en paralelo se monitoreó el descenso de pH con un potenciómetro por inmersión del electrodo previamente calibrado como se describe en el procedimiento 3.2.6.

Para el control de la producción de la sustancia antagónica, se utilizaron placas estériles con medio TSA enriquecido con 0.5% de extracto de levadura inoculadas con 45 μ L de *L. innocua* (60% Transmitancia). Las placas fueron secadas durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, con ayuda de un sacabocado se realizó perforaciones de 9 mm de

diámetro en cada placa. A cada pozo, se le adicionó 40 µl de cada uno de los sobrenadantes libre de células neutralizadas por el método difusión en pozos. Todo el procedimiento fue realizado dentro de una cabina de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Todas las placas fueron selladas con cinta parafilm e incubadas boca abajo durante 30 °C durante 24 horas para después medir el halo de inhibición (Gong et al. 2010).

3.2.10 Caracterización molecular de las cepas BAL aisladas de tocosh que presentan antagonismo contra *L. innocua*.

A. Obtención de ADN bacteriano mediante el uso del Kit de extracción GeneJET Genomic DNA Thermo SCIENTIFIC

En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se colectó el caldo inoculado con la cepa a ensayar, aproximadamente 2×10^9 células/mL. Se centrifugó por 10 minutos a 5000 g. luego de lo cual se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 180 µl de buffer lisis y se incubó por 30 minutos a 37 °C. Se añadió 200 µl de solución lisis y 20 µl de Proteinasa K y luego de mezclar bien con vortex se incubó la muestra a 56 °C mezclando con el vortex ocasionalmente hasta que las células se lisen completamente por 30 minutos. Se adicionó 20 µl de solución RNasa A mezclando con el vortex e incubando la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se adicionó 400 µl de etanol al 50%, luego de mezclar bien, se transfirió el preparado lisado a una columna de purificación GeneJET insertada en un tubo colector. Se centrifugó la columna por 1 minuto a 6000 g. Se desechó el tubo colector, seguidamente se coloca la columna de purificación dentro de un nuevo tubo colector de 2 ml y se adicionó 500 µl de buffer de lavado I. Se centrifugó por 1 minuto a 8000 g. Se descartó el líquido sobrante y se colocó la columna de purificación de nuevo en el tubo colector. A continuación, se adicionó 500 µl de buffer de lavado II dentro de la columna de purificación. Se centrifugó por 3 minutos a máxima velocidad (12,000 g). Luego se descartó el tubo colector y se transfirió la columna de purificación a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml estéril. Para luego, adicionar 200 µl de buffer elución al centro de la membrana de la columna de purificación. Se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 minuto a 8000 g. Por último, se descartó la columna de purificación y el ADN purificado se almacena a -20 °C.

B. Verificación de la calidad del ADN extraído

Se preparó un gel de agarosa al 1 % en buffer Tris-Borato-EDTA 1X (TBE 1X), dimensiones 15 x 10 cm. El gel solidificado se colocó en el interior de una cámara de

electroforesis y sumergido en buffer TBE 1X. Para cada cepa ensayada, se procedió a mezclar 5 μ L ADN purificado con 1.0 μ L de buffer tampón de carga 6X. Las mezclas anteriores se cargaron en cada uno de los pocillos del gel, destinando el primer pocillo al marcador de peso molecular (1 μ L de DNA Ladder Plus (Fermentas Inc., USA) + 1 μ L de buffer de carga + agua MilliQ c.s.p. 4 μ L). Cargado el gel, se procedió al cierre de la cámara de electroforesis y a la conexión de los electrodos. La corrida electroforética se llevó a cabo a 80 V por 60 min. Concluido el tiempo de corrida, se trasladó cuidadosamente el gel a una bandeja con solución acuosa de bromuro de etidio (0.5 μ g/mL), dejando reposar durante 15 min. Posteriormente se trasladó el gel a una bandeja con agua destilada y se dejó reposar durante 10 min para su lavado. Se colocó el gel contra la luz UV del fotodocumentador y se tomaron las imágenes pertinentes.

C. Amplificación BOX-PCR

El análisis de los perfiles de bandas BOX se realiza de acuerdo a Versalovic *et al.* (1991). Se empleó el cebador BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3').

La mezcla de reacción para la amplificación BOX-PCR (25 μ L), consta de: buffer Taq +KCl - MgCl₂ (1X), DMSO al 10 %, MgCl₂ 7.5 mM, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 1.25 mM cada uno), cebador BOX A1R 0.8 pmol/ μ L, Taq polimerasa 0.08 U/ μ L (Fermentas Inc., USA) y 5 μ L de ADN purificado. La reacción se realiza bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C x 3 min, 25 ciclos que consten de desnaturalización a 93 °C x 45 s, annealing a 53 °C x 1 min y extensión a 65 °C x 8 min. Finalmente, un ciclo de extensión final a 65 °C x 16 min.

Para comprobar la amplificación, 5 μ L de la reacción serán mezclados con 1 μ L de tampón de carga 6X. La corrida electroforética se efectúa en gel de agarosa 1.5% de dimensiones 15 x 15 cm, durante 3 h a 80 V.

D. Agrupamiento de perfiles BOX-PCR/ semejantes

Los perfiles BOX-PCR de cada una de las cepas ensayadas, se compararon visualmente entre sí, buscando bandas en común que muestren un mismo peso molecular. Se consideraron idénticos cuando todas las bandas en cada perfil tienen la misma distancia de migración aparente.

E. Amplificación 16S-PCR

Se eligieron representantes de cada agrupamiento diferente de los perfiles BOX-PCR para el secuenciamiento del gen ribosomal 16S, se usó el método descrito por Weisburg *et al.* (1991) para amplificar el fragmento de 1500 pares de bases (pb), el cual es amplificado por medio de una reacción de PCR con los cebadores:

fD1 (5' CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3').

La mezcla de reacción para la amplificación (25 μ L), consta de: buffer Taq +KCl - MgCl₂ (1X), MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 0.5 mM cada uno), cebadores 0.5 pmol/ μ L cada uno, Taq polimerasa 0.02 U/ μ L (Fermentas Inc., USA) y 5 μ L de ADN purificado. La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 93 °C x 2 min, 30 ciclos que consten de desnaturalización a 94 °C x 45 s, annealing a 62 °C x 45 s y extensión a 72 °C x 2 min. Finalmente 1 ciclo de extensión final a 72 °C x 5 min.

Las muestras se corrieron en gel de agarosa 1 % en buffer TBE 1X (dimensiones 15 x 10 cm) a 60 V por 150 minutos aproximadamente hasta que la banda más oscura del buffer alcanzó la mitad del largo del gel. Posteriormente se procedió a limpiar el producto de amplificación con el kit PCR *Cleanup de Axygen* para eliminar cualquier tipo de impureza que pueda dañar el producto amplificado.

F. Secuenciamiento del gen ribosomal 16S

Para el secuenciamiento del gen ribosomal 16S, los productos de PCR obtenidos y purificados fueron enviados a MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur), laboratorio que brinda dicho servicio. Tras la recepción de los cromatogramas y las secuencias enviadas por la empresa MacroGen Inc. Se procedió con la limpieza de las secuencias utilizando el programa BioEdit, versión 7.0.5.3 (Hall 1999). Las secuencias de cada cebador (fD1 y rD1), fueron verificadas, alineadas y empalmadas para su identificación. Las cepas de referencia de especies relacionadas registradas en el banco de datos de la "National Center for Biotechnology Information (NCBI)" (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) fueron identificadas por herramientas del BLASTN y con el servidor EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net/taxonomy>).

3.2.11 Análisis de datos

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados mostrados en las tablas representan los valores promedios (o valores logarítmicos) con su respectiva desviación estándar. Se utilizó un diseño completamente al azar, realizando un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Mínima Diferencia Significativa (LSD) para los ensayos de neutralización, adición de catalasa, proteasas y de diferentes temperaturas en los sobrenadantes libres de células de las BAL que presentaron actividad antagónica frente a *L. innocua*. Se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion 18–X64, donde el método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Las desviaciones estándar y los gráficos se realizaron con el programa Excel 2016.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas de extractos de tocosh.

En esta primera etapa se realizó la selección de colonias mediante resiembras en placas conteniendo agar MRS por el método de estrías por agotamiento, para lograr la purificación de las muestras provenientes de extractos de tocosh, en donde se pudo aislar 435 colonias presuntivas de bacterias ácido lácticas que crecieron en agar MRS a 28 °C. Para posteriormente guardarlas a -80 °C en 8 cajas criogénicas (anexo 4: B4) para su posterior identificación.

4.2 Identificación de los aislamientos mediante pruebas bioquímicas.

Se reactivaron los 435 aislados presuntivas de bacterias ácido lácticas en agar MRS a 28 °C y se sometieron a las pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias ácido lácticas, las cuales resultaron catalasa negativa, KOH negativas y Gram-positivas (anexo 4: B4). Estas son las pruebas generales utilizadas para la detección preliminar de BAL (Öz et al. 2017, Maldonado et al. 2018, Mulaw et al. 2019). Determinándose así que las 435 bacterias ácido lácticas aislados, no presentaron la enzima catalasa, además de presentar resistencia de la pared bacteriana a la solución alcalina, siendo considerados Gram-positivas por ser KOH negativos y una vez realizada la tinción simple a los aislados (Figura 7) se observó diferencias en su morfología.

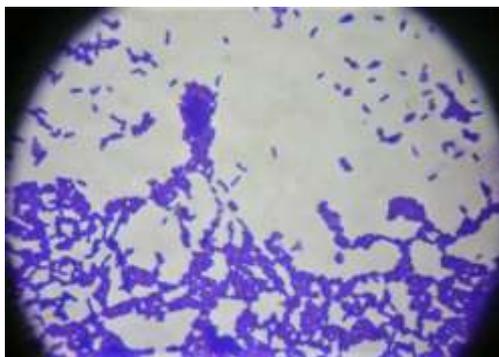


Figura 7: Tinción simple de una colonia aislada presuntiva como BAL al microscopio óptico. 1000X

Como se observa en la tabla 2, la morfología celular de todos los aislamientos bajo microscopio presentan una variedad de formas, tamaño y diferente grosor, tales como bacilos largos, bacilos cortos, cocobacilos gruesos, cocos y cocos pequeños. Las BAL tienen características morfológicas de bastón, cocobacilo y coco (Thokchom y Joshi 2012), además en estudios donde se aislaron BAL de verduras, frutas y productos fermentados también se evidencia una diversidad en cuanto a la morfología de estas bacterias (Savadogo et al. 2004, Sowmya et al. 2016, Sulmiyati et al. 2018).

Los aislamientos de BAL, en el presente estudio, podrían dividirse en tres grupos: bacilos, cocobacilos y cocos de los cuales hay predominancia de forma bacilar con 75.4 % seguido de cocobacilo 17.47 % y coco 7.13 % (Figura 8).

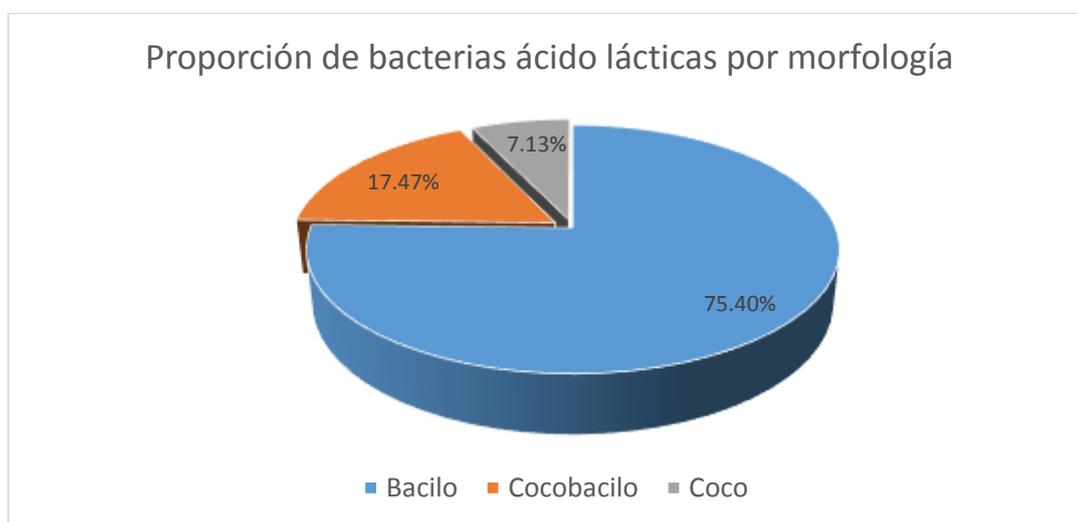


Figura 8: Proporción de bacterias ácido lácticas aisladas de tocosh según su Morfología.

Estos resultados son consistentes con estudios preliminares de Jiménez et al. (2018), donde se exploró la diversidad de BAL provenientes de muestras de tocosh encontrándose cepas BAL de las cuales hubo predominancia del género *Lactobacillus* seguido de *Weissella* y en menor cantidad de *Pediococcus*, estas dos últimas presentan morfología cocobacilar y coco respectivamente (Kamboj et al. 2015, Wade et al. 2018), para muestras de tocosh de ocho meses. Además, muestran que bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus* y *Leuconostoc* actúan durante el proceso de transformación del tocosh, y los *Lactobacillus* son predominantes en el producto final (Jiménez et al. 2018, Ray y Montet 2014).

Tabla 2: Diversidad de BAL aisladas provenientes de extractos de tocosh según su morfología.

		Morfología	Cantidad
BAL	Bacilo	Bacilo largo delgado	1
		Bacilo normal (+) delgado	3
		Bacilo normal (+)	8
		Bacilo normal grueso	7
		Bacilo normal delgado	3
		Bacilo normal	166
		Bacilo normal (-) grueso	4
		Bacilo normal (-)	73
		Bacilo corto (+)	1
		Bacilo corto	55
		Bacilo corto grueso	1
		Bacilo corto (-) grueso	2
		Bacilo corto (-)	1
		Bacilo curvo	3
	Cocobacilo	Cocobacilo (+)	2
		Cocobacilo grueso	1
		Cocobacilo	70
		Cocobacilo (-)	3
	Coco	Coco (+)	1
		Coco	27
Coco (-)		1	
Coco pequeño		2	

(+): Un poco más grande de lo normal.

(-): Un poco más pequeño de lo normal.

4.3 Actividad antagónica de cepas BAL contra *L. innocua*.

Con objeto de determinar la posible actividad antagónica de las 435 bacterias ácido lácticas aisladas de extractos de tocosh se usó la técnica de gota sobre la superficie (spot-on-lawn) utilizada originalmente por Gratia en 1946, y cuyo empleo actualmente está muy difundido (Del Campo et al. 2008, Jiménez et al. 2018, López Seijas 2017, Paitán et al. 2019, Fontana et al. 2015, Ramos et al. 2018), donde se usó como bacteria indicadora a *L. innocua* y como cepas control a *L. lactis* CRL 1109 y *L. plantarum* CRL 69. La técnica gota sobre la superficie permitió ver los halos de inhibición de 1 mm de diámetro o mayores como se observa en la Figura 9 los cuales se interpretaron de forma cualitativa (anexo 4: B4).

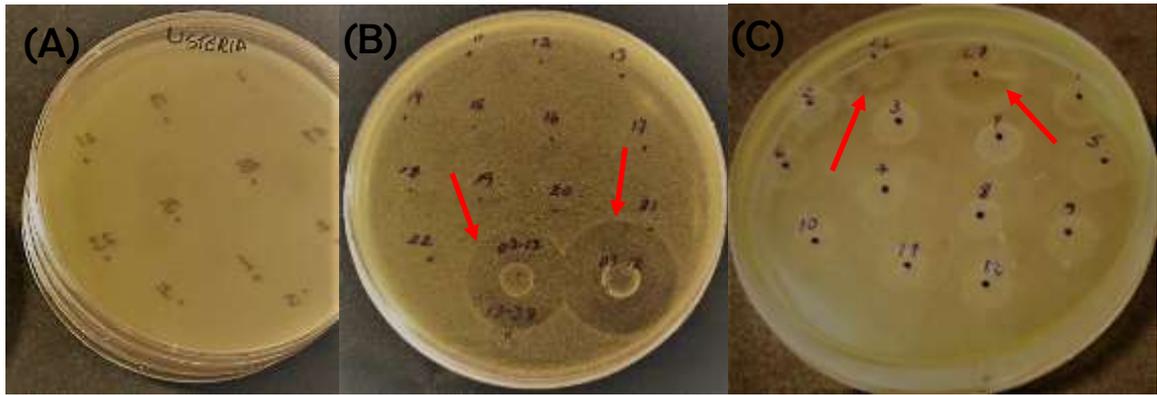


Figura 9: Actividad antagonística de cepas BAL contra *L. innocua*. (A) BAL que no presentaron actividad antagonística. (B) Dos BAL presentan actividad antagonística. (C) Controles bacteriocinogénicos *L. lactis* (LL), *L. plantarum* (LP) presentando actividad antagonística.

Los resultados muestran en primer lugar que sólo 2 de 435 aislamientos de BAL (anexo 4: B4, Caja 3) presentaron capacidad antagonística sobre *L. innocua* en agar MRS a 28 °C (Figura 9B) al igual que las dos cepas control (Figura 9C). Si bien los resultados muestran un bajo porcentaje (0,45%) de capacidad antagonística de esos aislados provenientes del extracto de tocosh frente a *L. innocua*, en comparación a otros estudios como Del Campo et al. (2008) cuyos resultados indicaron que 19 cepas BAL aisladas (5,42 %) provenientes de muestras de quesos frescos presentaron actividad antagonística frente a *L. monocytogenes*, los resultados de Paitán et al. (2019) mostraron que 5 aislamientos de cepas BAL (10,41 %) procedentes de muestras de heces de neonatos humanos presentaron actividad antimicrobiana frente a *L. innocua*, los resultados de Ramos et al. (2018) mostraron que 12 cepas BAL aisladas (11 %) presentes en los diferentes pasos de la cadena de producción de tunta inhibieron el crecimiento de *L. innocua* y los resultados de Jiménez et al. (2018) registraron que 2 aislamientos de *Leuconostoc mesenteroides* (9 %) y 3 *Lactobacillus sakei* (11 %) provenientes de muestras de tocosh presentaron capacidad antagonística frente a *L. innocua*. Lo más probable es que estas diferencias en los porcentajes de actividad antagonística se deban a que las pruebas de identificación de BAL que se usaron como la de KOH y tinción simple con cristal violeta en vez de tinción Gram no fueron lo suficiente precisos y así se trabajó con otros tipos de bacterias que no son BAL. Como también se deba a la procedencia de las cepas BAL aisladas y a las condiciones que han sido sembrados e incubados para los ensayos de actividad antagonística.

En segundo lugar, las BAL son ampliamente conocidos por su capacidad para inhibir los patógenos alimentarios, como *Listeria* spp., mediante la producción de compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de oxígeno y bacteriocinas (Banaay et al.

2013, Durlu-Ozkaya et al. 2007, Silva et al. 2018). Con lo cual se explicaría que los halos de inhibición (Figura 8B) formados contra la cepa sensible se deben al menos a un compuesto antimicrobiano producido por estas dos BAL aisladas del extracto de tocosh.

4.4 Caracterización fisiológica

Los resultados indicaron que 2 BAL aisladas de extractos de tocosh mostraron actividad antagonica frente a *L. innocua*, las cuales fueron identificadas con códigos 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13. Parte de la caracterización de estos aislados consistió en evaluar su crecimiento en caldo M.R.S. a 28 °C durante 99 horas, como se describió en la metodología, y a la vez observar el comportamiento que presenta la curva de pH en dicho periodo de incubación. Los resultados se presentan en la Figuras 10 y 11.

En el caso del aislado 2TH03-BL12 (Figura 10) la curva de crecimiento comenzó con una concentración de 6.24×10^6 UFC/ml y un pH inicial de 5.85. El crecimiento exponencial se mantuvo aproximadamente hasta las 9 horas alcanzando una concentración de 2.82×10^8 UFC/ml luego de lo cual llegó a la fase estacionaria en la que permaneció hasta las 48 horas con una concentración de 3.68×10^8 UFC/ml, tiempo en que el cultivo bacteriano inicio su fase de muerte. Con respecto a la curva de pH asociada al crecimiento del aislado 2TH03-BL12, durante la fase exponencial se observó un pH de 5.16 (9 horas), además alcanzó un pH de 4.36 a las 48 horas de incubación y al cabo de las 99 horas llegó a un pH de 4.04.

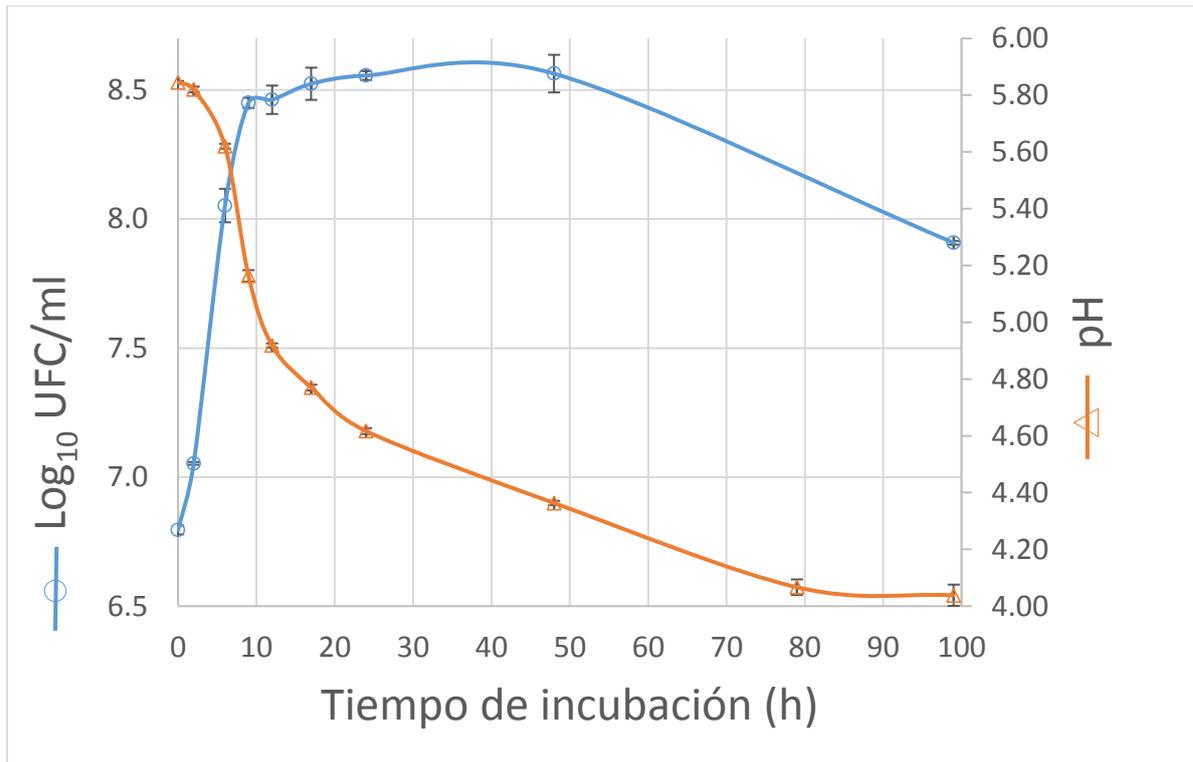


Figura 10: Dinámica de Crecimiento de 2TH03-BL12 en caldo MRS a 28 °C. Curva de crecimiento (—○—); pH (—△—); las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).

Para el caso del aislado 2TH03-BL13 (Figura 11) la curva de crecimiento comenzó con una concentración de 4.00×10^7 UFC/ml y un pH inicial de 5.81. El crecimiento exponencial se mantuvo hasta las 24 horas alcanzando una concentración de 3.30×10^9 UFC/ml luego de lo cual llegó a la fase estacionaria en la que permaneció hasta las 48 horas con una concentración de 3.73×10^9 UFC/ml, tiempo en que el cultivo bacteriano inicio su fase de muerte. Con respecto a la curva de pH asociada al crecimiento del aislado 2TH03-BL13, durante la fase exponencial se observó un pH de 3.94 (24 horas), además alcanzó un pH de 4.36 a las 48 horas de incubación y al cabo de las 99 horas llegó a un pH de 4.32.

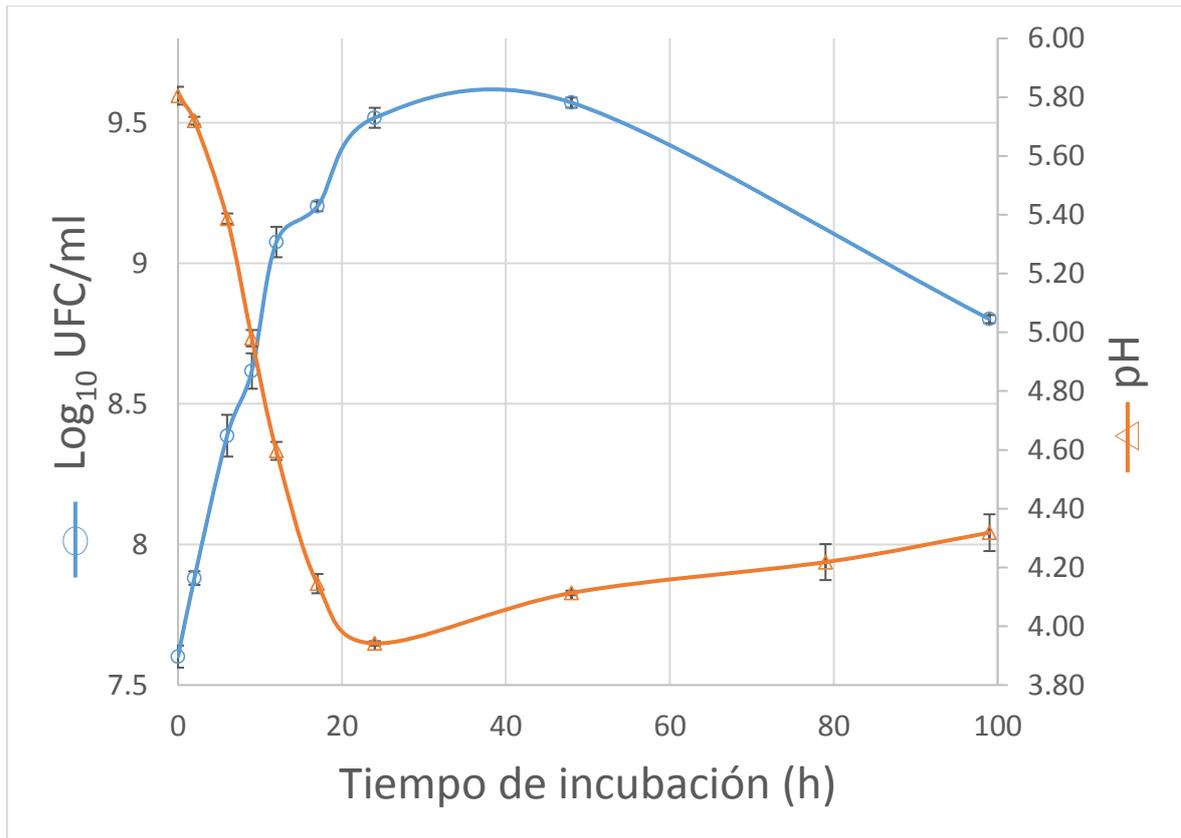


Figura 11: Dinámica de Crecimiento de 2TH03-BL13 en caldo MRS a 28 °C. Curva de crecimiento (○); pH (△); las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).

Para ambos aislados (Figura 10 y 11) se evidencia una disminución del pH en el medio de cultivo llegando a las 99 horas de incubación un pH final de 4.04 para 2TH03-BL12 mientras que para 2TH03-BL13 registro el pH de 3.94 como el más bajo a las 24 hora de incubación. Estos resultados son consistentes con las características de crecimiento de BAL ya que estos producen metabolitos como ácido láctico, ácido propiónico y ácido acético generados de un metabolismo heterofermentativo del microorganismo (Gänzle 2015), esta producción de ácidos orgánicos sería una explicación de la disminución del pH en el medio de cultivo que a su vez varía las condiciones óptimas de crecimiento para *Listeria* spp. entre ellas *L. monocytogenes* y *L. innocua*, las cuales han sido reportadas con un pH de crecimiento entre (4.1 -9.6) (Ochiai et al. 2020, Magalhães et al. 2016, García Echeverry et al. 2018).

4.5 Caracterización de sustancias antagónicas contra *L. innocua*.

La determinación de los factores de antagonismo, se procedió primero con los sobrenadantes libres de células (SLC) como control (Figura 12A) observándose, en este caso la inhibición contra la cepa sensible, esto comprueba que no es necesario que las bacterias 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 tienen que estar presentes en el sobrenadante para que se produzca una actividad antagónica, además de deducir que las sustancias antagónicas son de origen extracelular ya que se encuentran en los sobrenadantes, estos resultados también se obtuvieron en investigaciones anteriores al observar la formación de halos de inhibición en los SLC frente a *L. innocua* y *L. monocytogenes* (Moreira 1993, Del Campo et al. 2008, Zapata et al. 2009, Paitán et al. 2019). En el caso de Moreira 1993, el diámetro de los halos de inhibición de SLC de *Pediococcus* sp. frente a *L. innocua* estuvieron entre 9.0 y 18.2 mm, sin embargo, para este trabajo se observó la formación de halos de inhibición de los aislados 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 con promedio de 33.40 y 30.74 mm (tabla 3) respectivamente.

En paralelo se procedió a la neutralización de los SLC (Figura 12B) ajustando el pH cercano a la neutralidad (~7.0), este tratamiento permitió determinar que al neutralizar los ácidos orgánicos presentes en el sobrenadante con NaOH la cepa sensible continuó siendo inhibida, resultados similares se obtuvo en la investigación de Del Campo et al. (2008) donde se evidencio que dos BAL presentaron inhibición positiva en contra de *L. monocytogenes* al neutralizar los SLC. Si bien los valores de pH medidos para las dos cepas aisladas a las 24 horas de incubación fueron ácidos (entre 4-5 para 2TH03-BL12 y aproximadamente 4 para 2TH03-BL13) se determinó que tal reducción de pH, no fue suficiente para explicar la inhibición observada frente a *L. innocua* ya que el diámetro de los halos de inhibición obtenidos para los aislados 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 midieron en promedio 32.20 y 31.44 mm respectivamente (tabla 3) y estos no representan una reducción significativa comparándolos con el diámetro de los halos obtenidos solo con SLC.

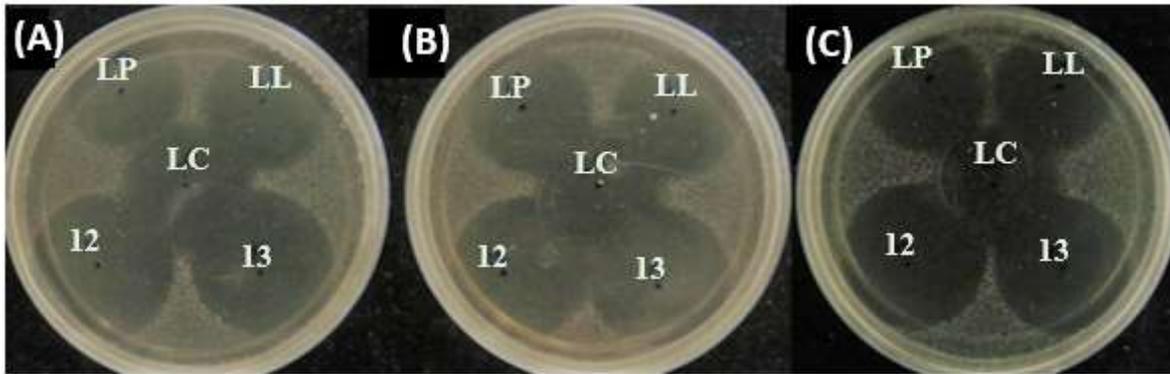


Figura 12: Actividad antagonística de los SLC de las cepas 2TH03-BL12 (12), 2TH03-BL13 (13) y controles bacteriocinogénicos *L. lactis* (LL), *L. plantarum* (LP), *L. curvatus* (LC) frente a *L. innocua*. (A) Control, (SLC). (B) SLC neutralizado. (C) SLC neutralizado y sometido a la acción de catalasa.

Para excluir que la inhibición fuera debida a la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a los SLC que mostraron actividad después de ser neutralizados fueron tratados con catalasa. Después de la inactivación de la catalasa se probó la actividad residual y se evidenció que seguía existiendo inhibición sobre *L. innocua* (Figura 12C). Si bien la actividad antimicrobiana del peróxido de hidrógeno está bien documentada y el efecto antagonístico de este compuesto se observa en muchos microorganismos, entre los cuales se encuentra *Listeria* spp. (Del Campo et al. 2008, Castro et al. 2011) los resultados mostrados para este ensayo evidencian la presencia de halos de inhibición frente a *L. innocua* con diámetros de 32.70 y 30.10 mm para 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 respectivamente (tabla 3), resultados parecidos han sido reportadas en la investigación de Castro et al. (2011) donde la actividad antimicrobiana de BAL frente a *L. innocua* aun continua después de haber sometido el SLC frente a la acción de la catalasa. Determinándose así, que el H_2O_2 no tuvo efecto sobre la actividad inhibidora.

Además, los resultados que se muestran en la tabla 3, indican que no hay diferencias significativas entre los diámetros de los halos de las dos cepas aisladas, lo que indica que otra sustancia, distinta de ácido o H_2O_2 , presente en el SLC es la que tiene efecto antagonístico.

Tabla 3: Actividad antagónica de los SLC de las cepas 2TH03-BL12, 2TH03-BL13 y controles bacteriocinogénicos *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. curvatus* frente a *L. innocua*.

Cepa	Antagonismo frente a <i>L. innocua</i> Diámetro de halo de inhibición (mm)		
	SLC (Control)	SLC Neutralizado	SLC Catalasa
2TH03-BL12	33.40 ± 0.60 ^a	32.20 ± 0.99 ^a	32.70 ± 0.19 ^a
2TH03-BL13	30.74 ± 0.20 ^a	31.44 ± 0.14 ^a	30.10 ± 0.38 ^a
<i>L. lactis</i>	28.06 ± 0.53 ^a	27.87 ± 0.24 ^{ab}	27.20 ± 0.12 ^b
<i>L. plantarum</i>	27.12 ± 0.26 ^{ab}	27.70 ± 0.34 ^a	26.87 ± 0.31 ^b
<i>L. curvatus</i>	29.83 ± 0.16 ^a	29.80 ± 0.16 ^a	27.32 ± 0.38 ^b

Todos los valores son promedios ± desviación estándar.

^{a-b} Valores con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

4.5.1 Efecto de tratamiento con proteasas

En esta etapa de la investigación, se repitió el uso de los SLC que se utilizaron en la prueba de sobrenadantes con catalasa. A fin de realizar una caracterización primaria de los SLC con posible actividad bacteriocinogénica, se estudió la posible naturaleza proteica de las sustancias antagónicas presentes en los sobrenadantes, para lo cual se evaluó la acción ejercida sobre su actividad por las siguientes enzimas proteolíticas: proteinasa K, proteinasa de *Streptomyces*, α -quimiotripsina y tripsina.

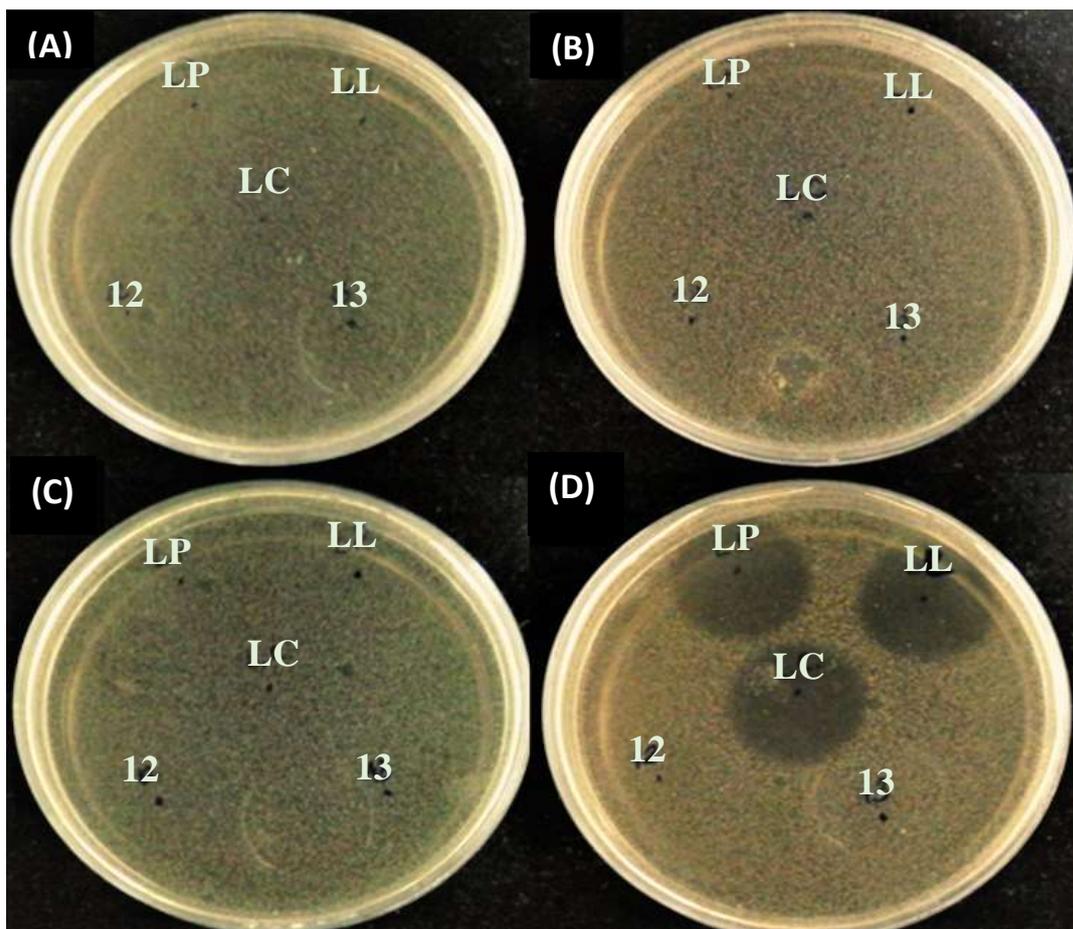


Figura 13: Efecto de diversas proteasas en la actividad antagónica de los SLC de las cepas 2TP03-BL12 (12), 2TP03-BL13 (13) y controles bacteriocinogénicos *L. lactis* (LL), *L. plantarum* (LP), *L. curvatus* (LC) frente a *L. innocua*. A. SLC neutralizado y sometido con proteinasa K. B. SLC neutralizado y sometido con proteinasa de *Streptomyces*. C. SLC neutralizado y sometido con α -quimiotripsina. D. SLC neutralizado y sometido con tripsina.

En la tabla 4, se observa el efecto de diversas enzimas en la actividad inhibidora del SLC de los aislados 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13, determinándose que los tratamientos con enzimas proteolíticas utilizadas siempre produjeron la reducción total en los diámetros de los halos de inhibición para los distintos sobrenadantes frente a *L. innocua* (Figura 13), salvo en el caso para los tres controles bacteriocinogénicos usados (*L. lactis*, *L. plantarum* y *L. curvatus*) evidenciando que para estas tres cepas control las actividades inhibitorias detectadas fueron parcialmente inactivadas con tripsina (Figura 13D), donde sus valores promedio de 28.06, 27.12 y 29.83 mm (control, tabla 3) se redujeron hasta 24.19, 23.16 y 22.72 mm.

Según los resultados obtenidos en este trabajo la sensibilidad de la actividad inhibitoria presente en los SCL de los aislados 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 a las enzimas proteolíticas es igual a la observada por otros investigadores como Del Campo et al. (2008) donde las sustancias inhibitorias en los SLC de sus tres cepas BAL aisladas presentaron inactivación

por acción de las enzimas proteolíticas (α -quimiotripsina y proteinasa K), al igual que en los trabajos de Woraprayote et al. (2015) y (Ogunbanwo et al. 2003) donde las bacteriocinas producidas por las BAL aisladas fueron inactivadas por completo por la acción de las enzimas proteolíticas tripsina, α -quimiotripsina y proteinasa K.

Tabla 4: Efecto de diversas proteasas en la actividad antagonista de los SLC las cepas 2TP03-BL12, 2TP03-BL13 y controles bacteriocinogénicos *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. curvatus* frente a *L. innocua*.

Cepa	Antagonismo frente a <i>L. innocua</i>			
	Diámetro de halo de inhibición (mm)			
	Proteasas			
	Proteinasa K	Proteinasa de <i>Streptomyces</i>	α -Quimiotripsina	Tripsina
2TH03-BL12	-	-	-	-
2TH03-BL13	-	-	-	-
<i>L. lactis</i>	-	-	-	24.19 \pm 0.72
<i>L. plantarum</i>	-	-	-	23.16 \pm 0.67
<i>L. curvatus</i>	-	-	-	22.72 \pm 0.74

“-“ halo de inhibición no fue observado.

Todos los valores son promedios \pm desviación estándar.

Si bien se trata sólo de un ensayo de caracterización primaria, el efecto de los tratamientos con enzimas proteolíticas indica la probable presencia de compuestos proteicos o peptídicos en la composición de todos los SLC ensayados. De acuerdo con su definición, las bacteriocinas son inactivadas, por lo menos, por proteasas de origen pancreático (tripsina y α -quimiotripsina) o de otros orígenes (Moreira 1993), esto es una ventaja importante de las bacteriocinas ya que las enzimas digestivas las destruyen (pueden romperse fácilmente por medio de proteasas y son rápidamente inactivadas en el estómago y en el intestino delgado); este hecho indica que la ingesta de estos compuestos no alterara la ecología de tracto digestivo evitándose así que lleguen a ocasionar efectos secundarios (Aguirre 2016).

4.5.2 Efecto del tratamiento térmico

En cuanto a la sensibilidad a la temperatura, al realizar el ajuste de pH de los SLC, la inactivación de la catalasa y someter a cuatro tratamientos térmicos de 70 °C durante 10, 30 y 50 minutos y a 100 °C durante 10 minutos se observa que todos los SLC estudiados

presentaron termoresistencia en las condiciones ensayadas (Figura 14). Es decir que en el tratamiento de 70 °C a diferentes tiempos al igual que el de 100 °C a 10 minutos ningún SLC demostró disminución significativa o desaparición total de su capacidad para inhibir a *L. innocua* para el caso de la cepa 2TH03-BL12, mientras que para 2TH03-BL13 si se evidencio un aumento significativo en el diámetro de halo con el tratamiento de 100 °C a 10 minutos frente al tratamiento de 70 °C a diferentes tiempos. Resultados similares fueron reportados por (Aspri et al. 2017) en el estudio de la estabilidad del SLC que contiene compuestos antimicrobianos de *Enterococcus faecium* después de la exposición a diferentes tratamientos térmicos (30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C y 100 °C durante 20 minutos cada una). Dando como resultado que la bacteriocina presente en el sobrenadante retuvo un grado considerable de actividad después de los tratamientos a alta temperatura frente a *L. monocytogenes*.

Posiblemente la sustancia antagónica presente en los aislados 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 sea una sustancia tipo bacteriocina, ya que de acuerdo a la clasificación de las bacteriocinas se ha reportado que los que pertenecen a la subclase IIa son péptidos termoestables de bajo peso molecular sin modificaciones y una de sus principales características que poseen es una fuerte actividad inhibitoria sobre el género *Listeria* (Agudelo et al. 2015, Cardoso 2010). Además la característica de termorresistencia de estas bacteriocinas parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria o debido a la formación de pequeñas estructuras globulares con regiones fuertemente hidrofóbicas, como así también a la presencia de entrecruzamientos estables y a un elevado contenido de glicina (Muriana y Klaenhammer 1991, Park et al. 2003, Vásquez et al. 2009, Cardoso 2010). Autores como Ahn et al. (2017), en su estudio de producción de bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* aislada de muestras de malta, evidencian que después del calentamiento del SLC de esta BAL (60 °C, 80 °C y 100 °C durante 10 y 30 minutos respectivamente) presentó actividad antagónica frente a *L. innocua* y *L. monocytogenes*, determinando que la bacteriocina presente en el SLC posee estabilidad a altas temperaturas. Así mismo, en un estudio realizado por Pinto et al. (2009) donde aislaron bacteriocinas parcialmente purificadas de *Enterococcus faecium* y *Pediococcus pentosaceus* provenientes de mariscos no fermentados como ostras, mejillones y almejas. Evidencian que estos después de ser expuestos a diferentes tratamientos térmicos (60 °C, 80 °C, durante 2 horas y 100 °C, 120 °C durante 20 minutos) para luego hacer la prueba de antagonismo frente a *L. innocua* y *L. monocytogenes* ambas bacteriocinas presentaron cierto

grado de resistencia manteniendo hasta el 50 % de la actividad cuando fueron tratados a 100 °C y 120 °C durante 20 minutos.

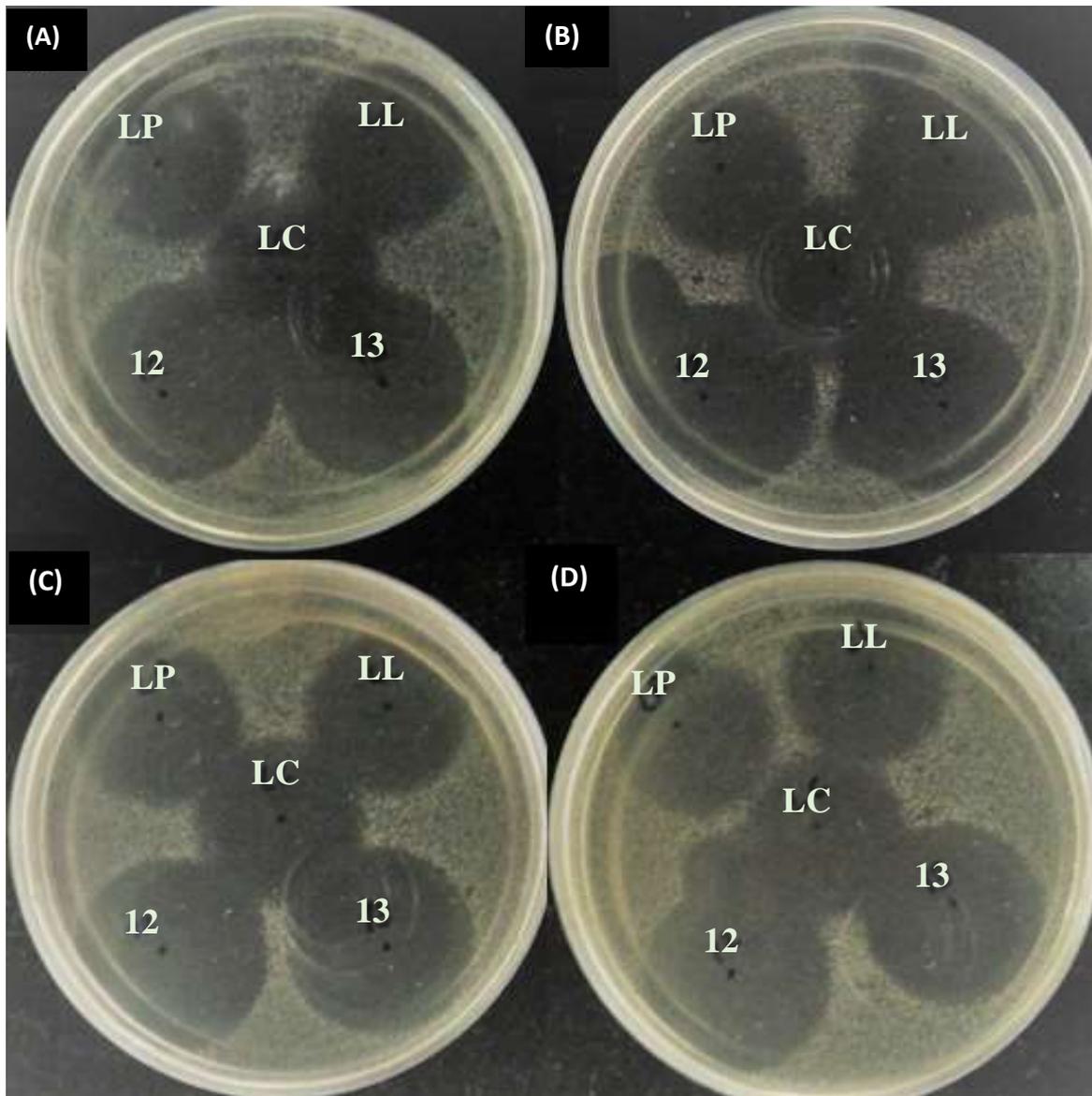


Figura 14: Efecto del tratamiento térmico a diferentes temperaturas en la actividad antagónica de las cepas 2TP03-BL12(12), 2TP03-BL13(13) y controles bacteriocinogénicos *L. lactis* (LL), *L. plantarum* (LP), *L. curvatus* (LC) frente a *L. innocua*. A. SLC neutralizado y sometido a 70°C durante 10 minutos. B. SLC neutralizado y sometido a 70°C durante 30 minutos. C. SLC neutralizado y sometido a 70°C durante 50. D. SLC neutralizado y sometido a 100 °C durante 10 minutos.

En la tabla 5, se puede comprobar que la actividad antibacteriana después de someter a los SLC a diferentes tratamientos térmicos el SLC del aislado 2TH03-BL12 presento mayor halo de inhibición en comparación al del aislado 2TH03-BL13, sin embargo, para el mismo

SLC a diferentes tratamientos térmicos el diámetro del halo de inhibición sólo se modificó de manera poco significativa manteniendo así una actividad residual elevada al igual que los tres controles bacteriocinogénicos. Resultados similares fueron reportados por Pascual et al. (2008), donde la actividad inhibitoria del SLC proveniente de la cepa de *Lactobacillus fermentum* L23 aislada de muestras de hisopos vaginales de mujeres sanas no fue alterada significativamente por tratamiento con calor. Luego de someter al SLC a 100 °C durante 60 minutos, presentó un diámetro de halo de inhibición de 27 mm, y el mismo diámetro se observó después de 10 minutos a 121 °C, además el control donde no hubo tratamiento térmico también presentó un diámetro de halo de inhibición de 27 mm. Estos resultados demuestran que la sustancia antagónica producida por la cepa L23 al igual que las producidas por los aislados 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 son resistentes al calor.

Tabla 5: Efecto del tratamiento térmico a diferentes temperaturas en la actividad antagónica de los SLC las cepas 2TP03-BL12, 2TP03-BL13 y controles bacteriocinogénicos *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. curvatus* frente a *L. innocua*.

Cepa	Antagonismo frente a <i>L. innocua</i>			
	Diámetro de halo de inhibición (mm)			
	Temperatura			
	70°C 10 min	70°C 30 min	70°C 50min	100°C 10 min
2TH03-BL12	31.43 ± 0.26 ^a	31.27 ± 0.51 ^a	31.41 ± 0.18 ^a	31.69 ± 0.05 ^a
2TH03-BL13	23.89 ± 0.26 ^a	24.14 ± 0.63 ^a	24.16 ± 0.11 ^a	25.08 ± 0.17 ^b
<i>L. lactis</i>	26.47 ± 0.16 ^a	24.96 ± 0.16 ^b	25.53 ± 0.19 ^c	24.83 ± 0.22 ^b
<i>L. plantarum</i>	26.29 ± 0.45 ^a	25.51 ± 0.15 ^c	26.38 ± 0.31 ^a	24.65 ± 0.10 ^b
<i>L. curvatus</i>	27.07 ± 0.05 ^a	25.45 ± 0.53 ^c	26.64 ± 0.29 ^{ab}	26.42 ± 0.34 ^b

Todos los valores son promedios ± desviación estándar.

^{a-c}Valores con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

4.5.3 Cuantificación de la actividad inhibitoria de sustancias antagonicas contra *L. innocua*

En este ensayo se cuantificó la actividad inhibitoria de la sustancia antagonica de los SLC de los aislados 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 mediante unidades arbitrarias (AU/ml).

Tabla 6: Actividades inhibitorias de sustancias antagonicas en los SLC de 2TH03-BL12, 2TH03-BL13 y controles bacteriocinogénicos *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. curvatus* frente a *L. innocua* por efecto de enzimas, pH y tratamiento térmico.

Tratamientos	Actividad inhibitoria (UA/mL) ^a frente a <i>L. innocua</i>				
	2TH03-BL12	2TH03-BL13	<i>L. lactis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. curvatus</i>
Enzima					
Proteinasa K	0	0	0	0	0
Proteinasa de <i>Streptomyces</i>	0	0	0	0	0
α-Quimiotripsina	0	0	0	0	0
Tripsina	0	0	1600	400	400
Catalasa	1600	1600	1600	1600	1600
Control (sin enzima)	1600	1600	1600	1600	1600
Temperatura					
70° C /10 min	1600	1600	1600	1600	1600
70° C / 30 min	1600	1600	1600	1600	1600
70° C / 50 min	1600	1600	1600	1600	1600
100° C / 10 min	1600	1600	1600	1600	1600
pH					
7.0	1600	1600	1600	1600	1600

^aEnsayo por Triplicado.

Como se observa en la tabla 6, la actividad de los SLC de 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 se eliminó por completo cuando se trató con enzimas proteolíticas excepto con la catalasa que presentó una actividad de 1600 AU/ml lo que confirma que la actividad inhibitoria es básicamente por una sustancia de naturaleza proteica y no por efecto del peróxido de hidrógeno. De igual forma se observa que la actividad posee una estabilidad con un pH 7 del 100% de 1600 AU/ml. Además, la actividad se mantuvo estable a 70 °C durante los tiempos de incubación de 10, 30, 50 minutos y 100 °C durante 10 minutos todas con un 100% de actividad (1600 AU/ml). Y, por último, se observó que en los controles: *L. lactis*, *L. plantarum* y *L. curvatus* presentaron actividad frente a la tripsina en comparación a los SCL de 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 cuya actividad con dicha enzima fue nula.

En este ensayo se usó la técnica de difusión en pozo y al igual que el de gota sobre la superficie, usado para los ensayos anteriores, son un par de métodos de varios que existen para la selección de BAL donde se busca la detección de una actividad antimicrobiana y/o

la de una bacteriocina (Spencer et al. 2003, O'Bryan et al. 2015). En los ensayos anteriores mediante la técnica gota sobre la superficie, los resultados obtenidos muestran que posiblemente la sustancia antagónica sea uno de tipo bacteriocina, es por ello que en este ensayo se desea cuantificar la actividad mediante el título de una preparación de SLC conteniendo a la posible sustancia tipo bacteriocina, que se basan comúnmente en el recíproco de la dilución más alta para causar un grado particular de inhibición de *L. innocua* (método de la dilución crítica) y en estos casos se usa las unidades arbitrarias por mililitro (AU/ml), siendo el método de dilución crítica adaptable al estudio preliminar de una bacteriocina cuando la proteína no ha sido adecuadamente caracterizada o purificada (Hoover y Steenson 1993, Jack et al. 1995, Ogunbanwo et al. 2003, Pinto et al. 2009, Pringsulaka et al. 2012, Woraprayote et al. 2015, Botthoulath et al. 2018).

Los resultados confirman, al igual que en los ensayos de gota sobre la superficie, la naturaleza de la sustancia antagónica presente en los aislados 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 donde la actividad inhibitoria no es debido por la presencia de ácidos orgánicos ni por acción del peróxido de hidrogeno así también la sustancia antagónica es de origen peptídico y termorresistente además, por comparación con los tres controles bacteriocinogénicos, la sustancia antagónica producida por ambas cepas aisladas posiblemente sea una sustancia de tipo bacteriocina. También se evidencia que los dos métodos (gota sobre la superficie y difusión en pozo) han dado los mismos resultados uno a nivel de diámetro de halo y el otro en AU/ml evidenciando la reproducibilidad de estos dos diferentes métodos para con los aislados 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 frente a *L. innocua*.

Resultados similares obtuvieron Botthoulath et al. (2018) donde la bacteriocina producida por *L. plantarum* presentó actividad nula (0 AU/ml) frente a las enzimas α -quimiotripsina, tripsina, proteinasa K excepto con la catalasa donde hubo una actividad de 2560 AU/ml, de igual forma presento una actividad de 100% con un pH 7 de 2560 AU/ml y no presentó ninguna reducción de la actividad en los tratamientos térmicos (70 °C y 100 °C por 15 minutos) dando un resultados de 2560 AU/ml. Otros autores como Ogunbanwo et al. (2003) en su estudio de las bacteriocinas producidas por *L. plantarum* y *L. brevis* reportaron una actividad con el tratamiento de catalasa de 6400 y 3200 AU/ml respectivamente, como también reportaron que no hubo actividad detectada con el tratamiento de α -quimiotripsina, tripsina, proteinasa K (0 AU/ml).

4.6 Cinética de crecimiento y producción de sustancias antagónicas

Para este ensayo la actividad de la sustancia tipo bacteriocina contra la cepa indicadora (*L. innocua*) se determinó por el tamaño del diámetro de halo de inhibición de los SLC de los aislados 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 frente a su crecimiento bacteriano a diferentes tiempos en caldo MRS a 28 °C por 48 horas.

En la Figura 15, muestra el crecimiento de 2TH03-BL12 y su actividad antimicrobiana por el ensayo de difusión en pozo. Se observa que la fase exponencial dura un poco más de las primeras 6 horas de incubación y la fase estacionaria hasta las 48 horas. En lo que representa a la producción de sustancia antagónica, posiblemente de tipo bacteriocina, el mayor diámetro de halo de inhibición (27.975 mm) se alcanzó después de 12 horas de incubación (fase estacionaria temprana). La actividad máxima de producción de una bacteriocina de *L. plantarum* subsp. *plantarum* SKI19 (Botthoulath et al. 2018), pediocina 05-10 producida por *Pediococcus pentosaceus* 05-10 (Huang et al. 2009) y bacteriocina HW01 producida por *Pediococcus acidilactici* HW01 (Ahn et al. 2017) también han sido registrados durante la fase de crecimiento estacionario temprana. Sin embargo, la producción comenzó a disminuir desde las 24 horas hasta alcanzar un diámetro de halo de 20.145 mm a las 48 horas de incubación esto puede ser debido al agotamiento de nutrientes o al efecto inhibitorio de un pH bajo (Ahn et al. 2017).

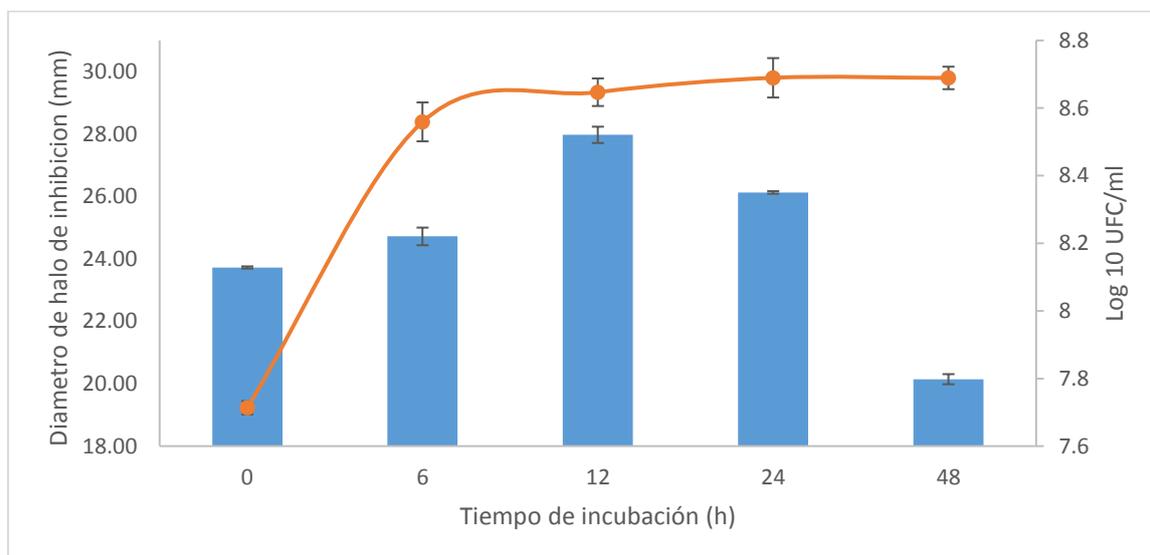


Figura 15: Dinámica de crecimiento y producción de una sustancia tipo bacteriocina de 2TH03-BL12 en caldo MRS a 28 °C. Curva de crecimiento (—●—); diámetro de halo de inhibición (■); las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).

El nivel de pH en la fermentación disminuyó de 5,45 a 5,22 durante las primeras 6 h de incubación, y se redujo continuamente a alrededor de 4,92 durante las siguientes 6 h, siendo a este tiempo el período máximo de producción de sustancia tipo bacteriocina. Seguidamente, en la fase estacionaria de 24 a 48 h, la producción de sustancia tipo bacteriocina se redujo moderadamente al igual que los niveles de pH de 4.71 a 4.53 en dicho periodo de tiempo. Powell et al. (2007) y (Botthoulath et al. 2018) informaron que un cambio tan pequeño en el pH del cultivo puede no facilitar la liberación de bacteriocina desde la superficie externa de las células productoras, además la digestión parcial del compuesto antibacteriano por enzimas proteolíticas secretadas por las células en la fase estacionaria podría haber afectado la disminución de la actividad antibacteriana (Gong et al. 2010).

En la Figura 16 se muestra el crecimiento de 2TH03-BL13 y su actividad antimicrobiana por ensayo de difusión de pozo. Se observa que la fase exponencial dura un poco más de las primeras 6 horas de incubación y la fase estacionaria hasta las 48 horas aproximadamente.

En lo que representa la producción de sustancias antagónicas, posiblemente de tipo bacteriocina, los mayores diámetros de halo de inhibición con 29.56 y 29.97 mm se alcanzaron después de 24 y 48 horas de incubación (fase estacionaria) respectivamente. Para este caso no se observó una disminución en la producción de la sustancia de tipo bacteriocina durante las 24 y 48 horas de incubación, posiblemente necesitando más tiempo de incubación para comenzar a observar, posterior a las 48 horas de incubación, una disminución del diámetro de inhibición. Resultados similares se observaron en la actividad máxima de producción de una bacteriocina de *L. brevis* FPTLB3 (Banerjee et al. 2013), Plantaricina LPL-1 producida por *L. plantarum* LPL-1 (Wang et al. 2018) y Plantaricina MG producida por *L. plantarum* KLDS1.0391 (Gong et al. 2010) registrados también durante la fase de crecimiento estacionario.

El nivel de pH en la fermentación disminuyó de 5,45 a 5,14 durante las primeras 6 h de incubación, y se redujo continuamente a alrededor de 4,66 durante las siguientes 6 h, seguidamente, en la fase estacionaria, el pH siguió decreciendo alrededor de 3,96 durante las siguientes 12 h, donde la producción de sustancia tipo bacteriocina aumentó moderadamente, para finalizar el pH aumentó alrededor de 4,12 durante las siguientes 12 h, siendo a este tiempo el período máximo de producción de sustancia tipo bacteriocina. Estos resultados muestran que esta sustancia de tipo bacteriocina posiblemente se mantiene estable a un nivel de pH de 4.12 alcanzado a las 48 horas de incubación. Resultados similares de una bacteriocina producida por *L. brevis* FPTLB3 (Banerjee et al. 2013) fueron observados

al presentar mayor producción de bacteriocina en la fase estacionario mientras el nivel de pH seguía disminuyendo gradualmente.

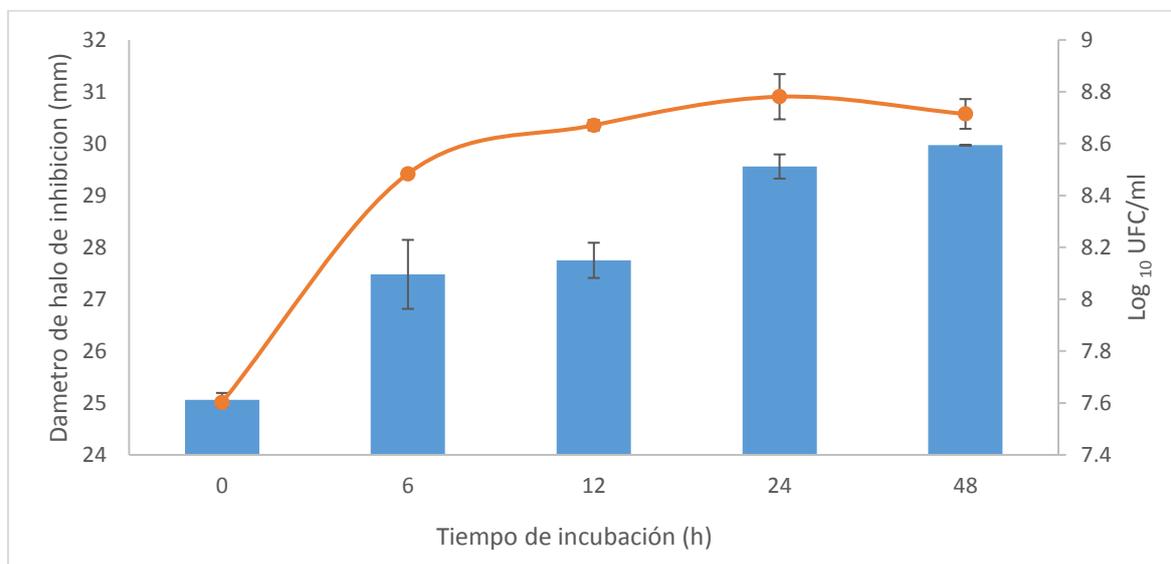


Figura 16: Dinámica de crecimiento y producción de una sustancia tipo bacteriocina de 2TH03-BL13 en caldo MRS a 28 °C. Curva de crecimiento (—●—); diámetro de halo de inhibición (■); las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).

Se observó halos de inhibición obtenidos a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas en ambos aislados, la presencia de un halo de inhibición en el tiempo cero de 23.73 y 25.06 mm para 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 respectivamente posiblemente se deba a una concentración elevada del cultivo celular para comenzar la curva de crecimiento, por lo cual no se aprecia un aumento gradual en los diámetros de los halos de inhibición originados por la producción de una sustancia antagónica sino por lo contrario desde el tiempo cero ya se observan halos de inhibición de diámetros significativos. Otros autores como Ahn et al. (2017) y (Gong et al. 2010) comenzaron la curva de crecimiento con una concentración de células menor a las del presente estudio y recién se observó halos de inhibición significativos al tiempo 4 y 12 respectivamente. La posible sustancia de tipo bacteriocina producida por 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13, evidenciada por los diámetros de los halos, se produjo de manera asociada al crecimiento (anexo 5: B5) lo que indicaría que la sustancia inhibitoria podría ser un metabolito primario, como el caso para varias bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (Huang et al. 2009, Ahn et al. 2017, Botthoulath et al. 2018). En este sentido, aunque la producción de estos péptidos está generalmente asociada al crecimiento celular, su clasificación como metabolitos primarios o secundarios no es clara (De Vuyst et al. 1996, Guerra y Pastrana 2002, Agudelo et al. 2015)(Guerra y Pastrana, 2002).

4.7 Caracterización molecular de las cepas BAL aisladas de tocosh que presentan antagonismo contra *L. innocua*

4.7.1 Amplificación PCR-BOX:

Para conocer la diversidad microbiana de las bacterias ácido lácticas aisladas de tocosh se extrajo el ADN (anexo 7: C7) y se amplificó los dos aislados que presentaron actividad antagonica frente a *L. innocua*.

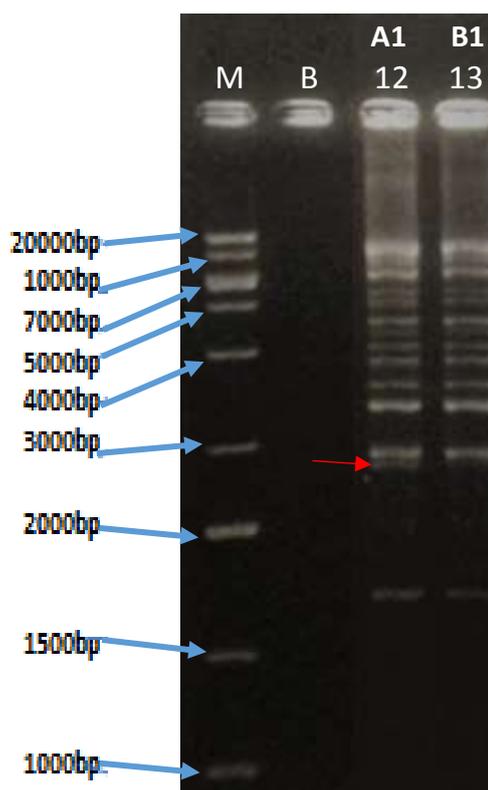


Figura 17: Perfiles PCR-BOX de las cepas 2TH03-BL12 (12) y 2TH03-BL13 (13). B: blanco, M: Marcador 1Kb.

Cada uno de los perfiles fue analizado de acuerdo a las bandas formadas, obteniéndose dos diferentes perfiles BOX-PCR (nominados A1 y B1), tal como se muestra en la Figura 17. De estos dos perfiles la diferencia se evidencia en la aparición de una banda más (Figura 17, flecha roja) para 2TH03-BL12 a diferencia de 2TH03-BL13 donde no se observa la presencia de esa banda.

4.7.2 Amplificación y secuenciamiento del gen 16S del ARNr

Para la amplificación del gen 16S se utilizaron los cebadores fD1 y rD1 que generan un producto de 1500pb aproximadamente. Las secuencias mostradas en sus cromatogramas fueron limpiados y contrastados con las secuencias disponibles en las bases de datos de

NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net/taxonomy>) (Weisburg et al. 1991, Liceta LLanco 2015, Paitán et al. 2019, Santos et al. 2018, Ramos et al. 2018).

Para ello, se seleccionaron las dos cepas 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 que presentaron una actividad antagónica frente a *L. innocua*. En la Figura 18, se pueden apreciar las bandas del gen 16S de los dos aislados.

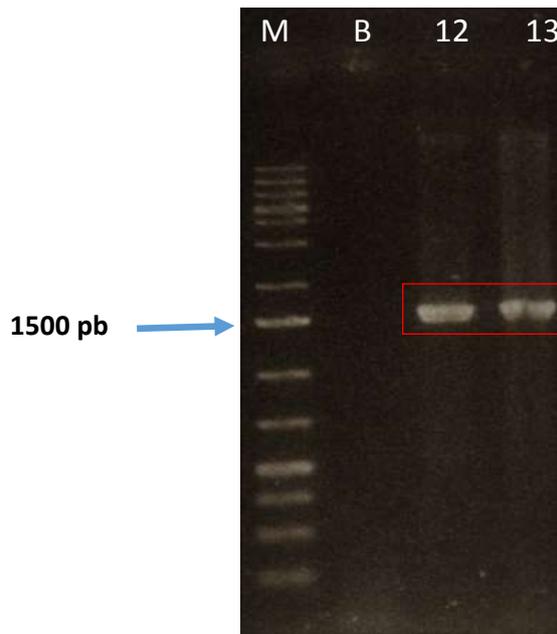


Figura 18: Electroforesis del gen 16S rRNA de dos cepas seleccionadas. B: blanco, M: Marcador 1Kb.

Tabla 7: Caracterización molecular de las cepas BAL aisladas de tocosh con capacidad antagónica frente a *L. innocua*.

Código de cepa	Perfil Box	Identificación molecular por secuenciamiento del gen ribosomal 16S	Número de Accesoión	Identidad (%)
2TH03-BL12	A1	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869 ^T	NR 116238.1	98.15
2TH03-BL13	B1	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869 ^T	NR 044704.2	98.70

En la Tabla 7, se presenta la identificación molecular de las dos cepas con capacidad antagonica ensayadas. Se encontró que los aislamientos pertenecen al género *Lactobacillus*. También se observó, así como ambos aislados presentaron perfiles Box diferentes (Figura 17), resultaron tener niveles de identidad de 98.15% y 98.70% con la cepa *Lactobacillus brevis* ATCC 14869^T para 2TH03-BL12 Y 2TH03-BL13 respectivamente. Stackebrandt y Goebel (1994) propusieron un valor umbral de identidad de secuencias del 97 %, según la recopilación de datos disponibles de secuencias de ARNr 16S en 1994, así cepas con igual o mayor porcentaje de identidad es probable que lleguen a estar relacionadas a nivel de especie. En microbiología, esto implica que la secuenciación del gen ribosomal 16S no aportará siempre una identificación definitiva a nivel de especie (Rodicio y Mendoza 2004). Además, actualmente se dispone de muchos más datos de secuencias de ARNr 16S como hace mención en su estudio Edgar (2018), presentando resultados que muestran que el umbral del 97% esta lejos de ser óptimo como una aproximación de especies y debe aumentarse como mínimo al 99 % si el objetivo es la aproximación a especie. Por ello los niveles de identidad con la cepa *Lactobacillus brevis* ATCC 14869^T son bajos como para afirmar que las cepas 2TH03-BL12 Y 2TH03-BL13 pertenecen a esa especie. Sin embargo, hay reportes como lo encontrado por Jiménez et al. (2018) quienes aislaron e identificaron *L. brevis* de muestras de tocosh fermentadas por 8 meses producidos por la comunidad de Tambogán (Huánuco, Perú) como también lo encontrado por Quillama et al. (2012) quienes aislaron e identificaron *L. brevis* de muestras de tocosh procedentes de Huánuco, Ancash y Junín.

Lactobacillus brevis (cepa tipo: ATCC 14869^T), es una bacteria ácido láctica cuyas células tienen forma bacilar con extremos redondeados, generalmente cortos y rectos (0.7–1.0 x 2.0–4.0 µm), microaerofílica, obligatoriamente heterofermentativa (utiliza la vía de la fosfoctolasa para producir una mezcla de ácido láctico, etanol, ácido acético y CO₂ como productos de fermentación de hexosas y su mejor crecimiento se da a un pH óptimo de 4-5 (Teixeira 2014). Además, puede aislarse de muchos entornos diferentes, incluidos alimentos y bebidas fermentados como leche, el queso, las plantas, los productos de cereales, el ensilaje, las verduras fermentadas, las carnes fermentadas, vino, cerveza, el estiércol de vaca, las heces, y la boca y el tracto intestinal de los humanos y otros animales (Ogunbanwo et al. 2003, Quillama et al. 2012, Banerjee et al. 2013, Teixeira 2014, Fusco et al. 2016, Son et al. 2017).

Este lactobacilo es considerado como GRAS (*generally regarded as safe*) (Urbina y Guerrero 2018) y tiene un amplio número de aplicaciones en la industria alimentaria en productos fermentados además de ser actualmente una de las más utilizadas como probióticos (Rönkä et al. 2003). La disminución del pH durante la fermentación crea un ambiente que es desfavorable para los patógenos y *L. brevis* produce cantidades significativas de ácido acético, que es un agente antimicrobiano más efectivo que el ácido láctico. Aunque la acidez es el factor antimicrobiano más importante, no se deben ignorar otros agentes inhibidores producidos por *L. brevis* (por ejemplo, bacteriocinas, CO₂, peróxido de hidrógeno, etanol y diacetilo). Varias cepas de *L. brevis* producen bacteriocinas algunas de ellas son: brevicina 37, brevicina 27 y brevicina 286 (Teixeira 2014). Estudios científicos reportan que varias cepas de *L. brevis* inhiben el crecimiento de patógenos del género *Listeria* tales como: *L. innocua*, *L. monocytogenes* y *L. denitrificans*, concluyendo que la capacidad antagónica se debe a un metabolito de origen proteico y demostrando mediante caracterización que se trata de bacteriocinas (Ogunbanwo et al. 2003, Son et al. 2017, Todorov et al. 2017).

IV. CONCLUSIONES

1. Se aislaron y caracterizaron fisiológicamente 435 bacterias ácido lácticas de extractos de tocosh provenientes del banco microbiano del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” de la Universidad Nacional Agraria la Molina. De las bacterias ácido lácticas, hay 75.4% con predominancia por tener morfología bacilar Gram positiva, seguido de cocobacilo 17.47 % Gram positiva y coco 7.13 % Gram positiva.
2. Sólo dos cepas, que representa el 0,45%, del total de bacterias ácido lácticas aisladas presentaron efecto antagónico demostrado en la actividad antibacteriana frente a la cepa sensible *L. innocua*. Las cuales fueron codificadas como 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13.
3. Los tratamientos de neutralización de ácidos orgánicos y adición de catalasa para la inactivación del H₂O₂ a los que fueron sometidos los sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos de los cultivos 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 demuestran que ninguno de estos dos compuestos es responsable de la actividad antagónica.
4. Los tratamientos con enzimas proteolíticas indican que la sustancia antagónica inhibitoria presente en los SLC obtenidos de los cultivos 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 son compuestos de naturaleza proteica o peptídica.
5. Los tratamientos térmicos de 70 °C durante 10, 30 y 50 minutos; y a 100 °C durante 10 minutos a los que fueron sometidos los SLC de 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13, demuestra que los compuestos responsables del antagonismo son termorresistentes.
6. Las sustancias antagónicas presente en los SLC de los aislados 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 tienen naturaleza protéica, son termorresistente e inhiben el crecimiento de *L. innocua*, características de una posible sustancia de tipo bacteriocina.

7. Los SLC de ambos aislados 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 presentaron una cuantificación de la actividad inhibitoria de una posible sustancia de tipo bacteriocina de 1600 AU/ml para los tratamientos de neutralización, catalasa y térmicos; y de 0 AU/ml para los tratamientos con enzimas proteolíticas.
8. Ambos aislados seleccionados 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 se desarrollaron en caldo MRS y acidificaron el medio de cultivo a 28 °C. Además, origina una sustancia antimicrobiana extracelular, cuya producción está asociada al crecimiento celular, y alcanza sus niveles máximos a las 12 y 48 horas de incubación para 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 respectivamente.
9. De la caracterización molecular, se encontró que los aislados 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 que presentaron actividad antagónica frente a *L. innocua* pertenecen al género *Lactobacillus*. Y resultaron tener niveles de identidad de 98.15% y 98.70% con la cepa *Lactobacillus brevis* ATCC 14869^T para 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar la investigación con las cepas aisladas 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 frente al microorganismo patógeno *L. monocytogenes* y comprobar si el efecto antagónico tiene un mayor espectro de inhibición.
2. Continuar el estudio de efecto antagónico con las cepas ya aisladas frente a *L. innocua* y *L. monocytogenes* a temperaturas bajas como 5, 10 y 15 °C; y la sensibilidad a pH de 2, 4, 6, 8, 10 y 12.
3. Realizar ensayos para la producción de la sustancia antagónica para las cepas 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 comenzando con un inóculo al 1% v/v y tomar muestras cada dos horas para proceder con el recuento bacteriano, los cambios del pH y controlar la producción de la sustancia tipo bacteriocina mediante la medición de título (AU/ml).
4. Continuar con el estudio para la caracterización y purificación parcial de la sustancia antagónica de tipo bacteriocina producidas por las cepas 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13, tales como, ultrafiltración, diálisis, cromatografía de intercambio catiónico y SDS-PAGE,
5. Realizar ensayos in vitro para demostrar el potencial probiótico de las cepas 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13, tales como, resistencia a sales biliares y tolerancia a pH bajo.
6. Realizar ensayos in situ de fermentación de papa incluyendo a las dos cepas aisladas y verificar si los extractos del producto tocosh y de su mazamorra mantienen efecto antagónico frente a *L. innocua*.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acedo, J.Z., Van Belkum, M.J., Lohans, C.T., McKay, R.T., Miskolzie, M. & Vederas, J.C. (2015). Solution Structure of Acidocin B, a Circular Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Applied Environmental Microbiology*. 81(8): 2910-2910.
- Adams, M. & Mitchell, R. (2002). Fermentation and pathogen control: A risk assessment approach. *International Journal of Food Microbiology*. 79(1-2): 75-83.
- Adams, M.R. & Moss, M.O. (2007). *Food Microbiology*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry. Tercera edición 314-320 p.
- Agudelo, N., Torres, M., Alvarez, C. & Vélez, L. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos hoy* 23(36): 63-72.
- Aguilar, C., Vanegas, C. & Klotz, B. (2010). Antagonistic effect of *Lactobacillus* strains against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in milk. *The Journal of dairy research* :1-8.
- Aguirre, Y.E. (2016). Estabilidad físico-química de una bacteriocina obtenida de *Lactobacillus graminis* con potencial control de bacterias patógenas y fitopatógenas. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Sonora-Mexico. Tesis.
- Ahn, H., Kim, J. & Kim, W. J. (2017). Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. *Food Control* 80:59-66.
- Álvarez A., Strauss B. & Orrego. (2011). Selección de extractos en tubérculos con efecto fungicida y/o bactericida. *Revista de Ciencia y Tecnología*. Hashi Santa Cruz. Bolivia 1(2):29-33.
- Álvarez-León, E-E., Román-Viñas, B. & Serra-Majem, L. (2006). Dairy products and health. A review of the epidemiological evidence. *British Journal of Nutrition* 96: 94-S99.

- Andina, C. (2010). Formación y capacitación en sistemas de producción, almacenamiento y consumo de alimentos para poblaciones indígenas de la comunidad andina (en línea, sitio web). Recuperado de: https://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0CDEQFjAD&url=http%3A%2F%2Fintranet.comunidadandina.org%2FDocumentos%2FREuniones%2FDTrabajo%2FSG_GAH_SAPI_XXIII_dt%25204.doc&ei=aCtVVeF3xbuCBJWLgJAN&usg=AFQjCNG1UIL4RPJUes pEdR-vMA4ODDtTUg&sig2=pI_tcrdmsupMRixkPzgJ5w&bvm=bv.93564037,d.eXY.
- Aspri, M., Field, D., Cotter, P.D., Ross, P., Hill, C. & Papademas, P. (2017). Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *International Dairy Journal* 73:1-9.
- Azadnia, P., Zamani, M.H., Ahmad, S.G., Babaki, A.K., Jashni, M.K. & Taarof, N. (2011). Isolation and Identification of *Thermophilic Lactobacilli* from Traditional Yoghurts of Tribes of Kazerum. *10(6):774-776*.
- Banaay, C.G.B., Balolong, M.P. & Elegado, F.B. (2013). Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes. Capítulo 24. Lactic Acid Bacteria in Philippine Traditional Fermented Foods. (Eds.). Croacia, p. 571-588.
- Banerjee, S.P., Dora, K.C. & Chowdhury, S. (2013). Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* FPTLB3 isolated from freshwater fish: Bacteriocin from *Lb. brevis* FPTLB3. *Journal of Food Science and Technology* 50(1): 17-25.
- Beasley, S.S. & Saris, P.E.J. (2004). Nisin-Producing *Lactococcus lactis* Strains Isolated from Human Milk. *Applied and Environmental Microbiology* 70(8): 5051-5053.
- Belitz, H-D; Grosch, W. & Schieberle, P. (2009). Food Chemistry. Chapter 18. Fruits and Fruit Products. 4ta ed. Berlin, Springer. 770-806 p.
- Van Belkum, M.J., Martin-Visscher, L.A. & Vederas, J.C. (2011). Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends in Microbiology* 19(8): 411-418.
- Benkerroum, N., Oubel, H., Zahar, M., Dlia, S. & Filali-Maltouf, A. (2000). Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis subsp. lactis* and application to control

- Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *Journal Applied Microbiology* 89(6): 960-968.
- Bille, J., Catimel, B., Bannerman, E., Jacquet, C. & Yersin, M. (1992). API Listeria, a new and promising one-day System to identify listeria isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 58(6): 1857-1860.
- Blandino, A., Al-aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D. & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* 36(6): 527-543.
- Botthoulath, V., Upaichit, A. & Thumarat, U. (2018). Characterization of Listeria-active bacteriocin produced by a new strain *Lactobacillus plantarum subsp. plantarum* SKI19 isolated from «sai krok e-san mu». *International Food Research Journal* 25(6): 2362-2371.
- Bravo, J.G. (1991). Harina de tocosh, caracterización y posibles usos en la industria. Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo - Perú. Tesis.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A. & Mietzner, T.A. (2013). Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. Chapter 3. Bacteriology. 26 ed. 192-193 p.
- Del Campo, M., Gómez, H.E. & Alaníz, R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *Revista Electrónica y Tecnológica e-Gnosis* 6: 1-17.
- Cardoso, M de las M. (2010). Caracterización y purificación parcial de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas de *Enterococcus*. Santa Fe-Argentina. Universidad Nacional del Litoral. Tesis.
- Carr, F.J., Chill, D. & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology* 28(4): 281-370.
- De Carvalho, A.A.T., De Paula, R.A., Mantovani, H.C. & De Moraes, C.A. (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. *Food Microbiology* 23(3): 213-219.
- Castro, M.P., Palavecino, N.Z., Herman, C., Garro, O.A. & Campos, C.A. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science* 87(4): 321-329.

- Ccapa, E. (2017). Estudio del mercado del tocosh (tuqush) (*solanlim andigenum fermentado – putrefacto*) y comercialización en la ciudad de Arequipa. Arequipa-Perú. Universidad Nacional de San Agustín. 1689-1699 p. Tesis.
- Centurión, M.S. & Takajara, M.E. (2004). Determinación de la incidencia de *Listeria monocytogenes* en pollos frescos y verduras frescas obtenidos en mercados y centros de abastecimiento de Lima Metropolitana. Lima-Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 13-20 p. Tesis.
- CFSAN. (2003). Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health From Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. EE.UU.
- Chen, H. & Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and food safety 2: 82-100.
- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. & Hernández, P.E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Food Science & Technology International 7(4): 281-305.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. & Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology 71(1): 1-20.
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiology Reviews 46(3): 269-280.
- Cornu, M., Kalmokoff, M. & Flandrois, J.P. (2002). Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. International Journal of Food Microbiology 73(2-3): 261-274.
- Cotter, P.D., Hill, C. & Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food. Food Microbiology 3:777-788.
- Criado, R., Gutie, J., Herranz, C., Herna, P.E. & Cintas, L.M. (2006). Immunochemical Characterization of Temperature-Regulated Production of Enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), Enterocin P, and Enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. Applied and Environmental Microbiology 72(12): 7634-7643.
- Curiale, M.S. & Lewus, C. (1994). Detection of *Listeria monocytogenes* in Samples Containing *Listeria innocua*. Journal of Food Protection 57(12): 1048-1051.

- Dahl, T.A., Midden, W.R. & Hartman, P.E. (1989). Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *Journal of Bacteriology* 171(4): 2188-2194.
- Daw, M.A. & Falkiner, F.R. (1997). Bacteriocins: Nature, Function and Structure. *Micron* 27(6): 467-479.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. & Ross, P. (2005). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16: 1058-1071.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L. & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal* 14: 273-285.
- Díaz, D. & Delgado, B. (2012). Efecto antibacteriano de la papa fermentada y su biodisposición en heridas infectadas. *Revista de Farmacia: Farmacotecnia y Producción*. Facultad de Ciencias de La Universidad de Distrito de Granada, España. 106(2): 105 – 123.
- Djadouni, F. & Kihal, M. (2012). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria and the Spectrum of their Biopeptides Against Spoiling Germs in Foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55(3): 435-443.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., Lynn, M., Drider, D., Fimland, G., He, Y. & McMullen, L.M. (2006). The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(2): 564-582.
- Durlu-Ozkaya, F., Aslim, B. & Ozkaya, M.T. (2007). Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *LWT* 40: 564-568.
- Edgar, R.C. (2018). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics* 34(14):2371-2375.
- Edy, W.B.H., Juan, R.L.L., Daphne, R.D., Mónica, R.T. & Teresa, A.F. (2015). Presencia de *Listeria monocytogenes* en canales porcinos en Lima, Peru. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* 26(1): 135-139.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G. & Coppola, S. (2001). Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel

- electrophoresis. *Current Microbiology* 42(3): 199-202.
- Farber, J.M. & Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *American Society for Microbiology* 55(3): 476-511.
- Farias, M.E., De Ruiz Holgado, A.A.P. & Sesma, F. (1994). Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: Inhibition of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 57(11): 1013-1015.
- Fontana, C., Cocconcelli, P.S., Vignolo, G. & Saavedra, L. (2015). Occurrence of antilisterial structural bacteriocins genes in meat borne lactic acid bacteria. *Food Control* 47: 53-59.
- Fusco, V., Quero, G.M., Chieffi, D. & Franz, C.M.A.P. (2016). Identification of *Lactobacillus brevis* using a species-specific AFLP-derived marker. *International Journal of Food Microbiology* 232: 90-94.
- Gabrielsen, C., Brede, D.A., Nes, I.F. & Diep, D.B. (2014). Circular bacteriocins: Biosynthesis and mode of action. *Applied and Environmental Microbiology* 80(22): 6854-6862.
- Gänzle, M.G. (2015). Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science* 2:106-117.
- García A., Esmérita F.M., Isidro G. & Edinson D. (2005). Técnicas de conservación de alimentos: El Tocosh. Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima-Perú. Tesis.
- García Echeverry, J.P., Gil Iral, J.E. & Botero Mazo, S. (2018). Control de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en co- cultivo con *Lactobacillus plantarum*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 20(2): 68-77.
- Ghraiiri, T., Chaftar, N. & Hani, K. (2012). Bacteriocins: Recent Advances and Opportunities. *Progress in Food Preservation* :485-511.
- Gong, H.S., Meng, X.C. & Wang, H. (2010). Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from «Jiaoke», a traditional fermented cream from China. *Food Control* 21(1):89-96.
- Gonzales De La Cruz, M., Baldeón Malpartida, S., Beltrán Santiago, H., Jullian, V. & Bourdy, G. (2014). Hot and cold: Medicinal plant uses in quechua speaking communities in the high Andes (Callejón de Huaylas, Ancash, Perú). *Journal of*

- Ethnopharmacology 155(2): 1093-1117.
- Gregersen, T. (1978). Rapid Method for Distinction of Gram-Negative from Gram-Positive Bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology 5(2): 123-127.
- Guerra, N.P. & Pastrana, L. (2002). Modelling the influence of pH on the kinetics of both nisin and pediocin production and characterization of their functional properties. Process Biochemistry 37(9):1005-1015.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium 41(2): 95-98.
- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E. & Klaenhammer, T.R. (1989). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 52(6): 384-387.
- Holzappel, W.H. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. International Journal of Food Microbiology 24: 343-362.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R. & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. The American Journal of Clinical Nutrition 73(2): 365-373.
- Hoover, D.G. & Steenson, L.R. (1993). Food Science and Technology. Chapter 2: Screening Methods for Detecting Bacteriocin Activity 23-39 p.
- Huang, Y., Luo, Y., Zhai, Z., Zhang, H., Yang, C., Tian, H., Li, Z., Feng, J., Liu, H. & Hao, Y. (2009). Characterization and application of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. Food Control 20(11): 1030-1035.
- Hugenholtz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 12(1-3): 165-178.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. & Evans, M.I.R. (1995). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. American Society for Microbiology 59(2): 171-200.
- Jiménez, E., Yépez, A., Pérez-Cataluña, A., Ramos Vásquez, E., Zúñiga Dávila, D; Vignolo, G. & Aznar, R. (2018). Exploring diversity and biotechnological potential of lactic acid bacteria from tocosh - traditional Peruvian fermented potatoes - by high

- throughput sequencing (HTS) and culturing. *LWT - Food Science and Technology* 87: 567-574.
- Kamboj, K., Vasquez, A. & Balada-Llasat, J.M. (2015). Identification and significance of *Weissella* species infections. *Frontiers in Microbiology* 6: 1-7.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49(3): 209-224.
- Koo, O., Eggleton, M., Bryan, C.A.O., Crandall, P.G. & Ricke, S.C. (2012). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on frankfurters formulated with and without lactate / diacetate. *Meat Science* 92(4): 533-537.
- Kuttner, A.G. (1966). Production of bacteriocines by group A streptococci with special reference to the nephritogenic types. *Journal of Experimental Medicine* (124): 279-291.
- Leroi, F., Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F. & Pre, H. (2009). Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology* 26: 638-644.
- Leroy, F. & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology* 15(2): 67-78.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Janisiewicz, W., Abadias, M., Kurtzman, C.P. & Camp, M.J. (2006). Biocontrol of the Food-Borne Pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Poona on Fresh-Cut Apples with Naturally Occurring Bacterial and Yeast Antagonists. *Applied and environmental microbiology* 72: 1135-1140.
- Liceta LLanco, M. (2015). Aislamiento y caracterización de *Pseudomonas* y *Bacillus* provenientes de la rizósfera de diferentes. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima-Perú. Tesis.
- Lindgren, S.E. & Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology* 87: 149-164.
- Liu, D., Ainsworth, A.J., Austin, F.W. & Lawrence, M.L. (2003). Identification of *Listeria innocua* by PCR targeting a putative transcriptional regulator gene. *FEMS Microbiology Letters* 223: 205-210.

- Liu, D., Lawrence, M.L., Austin, F.W. & Ainsworth, A.J. (2007). A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods* 71: 133-140.
- Liu, S., Han, Y. & Zhou, Z. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International* 44(3): 643-651.
- López Seijas, J. (2017). Biodiversidad de bacterias ácido lácticas asociada a la variedad Albariño (*Vitis vinifera L.*) cultivada en Val do Salnés. Estudio de sus aplicaciones. Universidad de Vigo. Vigo-España. Tesis.
- Magalhães, R., Ferreira, V., Brandão, T.R.S., Palencia, R.C., Almeida, G. & Teixeira, P. (2016). Persistent and non-persistent strains of *Listeria monocytogenes*: A focus on growth kinetics under different temperature, salt, and pH conditions and their sensitivity to sanitizers. *Food Microbiology* 57:103-108.
- Maldonado, N.C., Fico seco, C.A., Mansilla, F.I., Melián, C., Hébert, E.M., Vignolo, G.M. & Nader-Macías, M.E.F. (2018). Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle. *Livestock Science* 212: 99-110.
- Martín, A.M., (2008). Estudio polifásico de la diversidad microbiana de quesos artesanales elaborados con leche cruda de cabra. Universidad de Granada. Granada-España. Tesis.
- De Martinis, E.C.P., Santarosa, P.R. & Freitas, F.Z. (2003). Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados a vácuo. *Ciência & Tecnologia de Alimentos* 23(2):195-199.
- Milillo, S.R., Friedly, E.C., Saldivar, J.C., Muthaiyan, A., O'Bryan, C., Crandall, P.G., Johnson, M.G. & Ricke, S.C. (2012). A Review of the Ecology, Genomics, and Stress Response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52(8): 712-725.
- Milillo, S.R., Story, R.S., Pak, D., Bryan, C.A.O., Crandall, P.G. & Ricke, S.C. (2013). Antimicrobial properties of three lactic acid bacterial cultures and their cell free supernatants against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Environmental Science and Health* (48): 63-68.
- MINSA. (2019). Boletín epidemiológico del Perú. Lima-Perú. 8: 372-393.

- Moreira, W. (1993). Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus sp.* 347, de origen cárnico. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid :294.
- Mozzi, F., Raya, R.R. & Vignolo, G.M. (2010). Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications. Chapter 1. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. Mozzi, F; Raya, RR; Vignolo, GM (eds.). 1ra ed. 5-10 p.
- Mulaw, G., Sisay Tessema, T., Muleta, D. & Tesfaye, A. (2019). In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented ethiopian food products. International Journal of Microbiology 2019.
- Muriana, P.M. & Klaenhammer, T.R. (1991). Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. Applied and Environmental Microbiology 57(1): 114-121.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R. & Clemens, R.A. (1999). Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). Critical Reviews in Food Science and Nutrition 39(1): 13-126.
- Naupari G., Arias G. & Amarillo A. (1993). Estudio químico bromatológico y de la actividad antimicrobiana del tocosh. Boletín de la sociedad química del Perú. 59(2): 87-92.
- Nes, I.F., Diep, D.B. & Holo, H. (2007). Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. American Society for Microbiology 189(4):1189-1198.
- Nes, I.F. & Johnsborg, O. (2004). Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. Curr. Opin. Biotechnol 15(2): 100-104.
- O'Bryan, C.A., Crandall, P.G., Ricke, S.C. & Ndahetuye, J.B. (2015). Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: Analytical methods and applications 137-151 p.
- Ochiai, Y., Yoshikawa, Y., Mochizuki, M., Takano, T. & Ueda, F. (2020). Unique response characteristics in persistent strains of *Listeria monocytogenes* exposed to low pH. Food Microbiology 86(February 2019): 103312.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. & Onilude, A.A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. African Journal of Biotechnology 2(8): 223-235.

- Orihuela E. (1991). Estudio del proceso de elaboración del tocosh. Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo - Perú. Tesis.
- Orsi, R.H. & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(12): 5273-5287.
- Ouwehand, A. (2004). Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. In Salminen, S; Wright, A von; Arthur Ouwehand (eds.). New York, Marcel Dekker. p. 375-396.
- Öz, E., Kaban, G., Barış, Ö. & Kaya, M. (2017). Isolation and identification of lactic acid bacteria from pastırma. *Food Control* 77:158-162.
- Paitán, E., Santos, R., Sotelo, A., Zúñiga, D. & Vílchez, C. (2019). Caracterización molecular de bacterias con potencial probiótico aisladas de heces de neonatos humanos. *Revista peruana de Biología* 26(1):119-130.
- Parés, R. & Juárez, A. (2002). Bioquímica de los Microorganismos. Capítulo 6. Ácido Láctico. (ed). 74-78.
- Park, S.H., Itoh, K. & Fujisawa, T. (2003). Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. *Journal of Applied Microbiology* 95(2): 294-300.
- Pascual, L.M., Daniele, M.B., Giordano, W., Pájaro, M.C. & Barberis, I.L. (2008). Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology* 56(4): 397-402.
- Patton, G.C. & Van Der Donk, W.A. (2005). New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Current Opinion in Microbiology* 5(8): 543-551.
- Pérez, M., Vázquez, A., De la Fuente, N.M. & Barboza, J.E. (2016). Optimización De La Producción Y Actividad Antimicrobiana De. *ResearchGate* 1(1): 269-274.
- Pérez, R.H., Zendo, T. & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories* (13): 1-13.
- Perrin, M., Bemer, M. & Delamare, C. (2003). Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology* 41(11): 5308-5309.
- Pinto, A.L., Fernandes, M., Pinto, C., Albano, H., Castilho, F., Teixeira, P. & Gibbs, P.A. (2009). Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish:

- Potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *International Journal of Food Microbiology* 129(1): 50-58.
- Powell, J.E., Witthuhn, R.C., Todorov, S.D. & Dicks, L.M.T. (2007). Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal* 17(3): 190-198.
- Poysky, F.T., Paranjpye, R.N., Lashbrook, L.C., Peterson, M.E., Pelroy, G.A. & Eklund, M.W. (1993). Selective and Differential Medium for Isolation of *Listeria monocytogenes* from Foods. *Journal of Food Protection* 56(4): 326-329.
- Prentice, M. & Milka, M. (2005). Estudio del efecto de tocosh de papa como probiótico en el control del peso corporal y mayor crecimiento en ratas jóvenes frente a cultivo de *Lactobacillus acidophilus*. En: V Congreso Mundial de Medicina Tradicional, Facultad de Medicina Humana - Universidad de San Martín de Porres. Lima, Perú. 24-25 p.
- Pringsulaka, O., Thongngam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K. & Rangsiruji, A. (2012). Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control* 2(23): 547-551.
- Quillama, E., Dávila, S., Medina, A; Avalos, C. & Paredes, D. (2012). Evaluación de la biodiversidad láctica de «Tocosh», alimento fermentado tradicional de Perú. En: Resúmenes-Biotecnología XXI RC ICBAR. Lima-Perú.
- Ramírez, L.J.J., (2010). Evaluación de la viabilidad según ISO 7889/IDF 117 de los cultivos iniciadores *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* en yogurt y helado en almacenamiento y validación de un método para la enumeración del probiótico *Bifidobacterium lactis*. Instituto tecnológico de Costa Rica. Cartago - Costa Rica. Tesis.
- Ramos, E.R., Santos, R.A., Velázquez, E., Velezmoro, C.E. & Zúñiga, D.E. (2018). Genetic diversity and antimicrobial activity of lactic acid bacteria in the preparation of traditional fermented potato product 'tunta'. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 34(10).
- Rattanachaikunsopon, P. & Phumkhachorn, P. (2010). Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological*

- Research 1(4): 218-228.
- Ray, R.C. & Montet, D. (2014). Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods. Chapter 10. Indigenous fermented foods of Latin America. (ed.). 332-333 p.
- Report, A.E. (2006). Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Resistance: Implications for An Expert Report, Funded by the IFT Foundation. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 5:71-137.
- Riley, M.A. & Chavan, M.A. (2006). Bacteriocins: Ecology and evolution. Chapter 4. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. (eds.). 45-83 p.
- Riley, M.A. & Wertz, J.E. (2002). Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. Annual Reviews in Microbiology 56(1): 117-137.
- Rodicio, M.D.R. & Mendoza, M.D.C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica.
- Rodríguez, C., Rimaux, T., Fornaguera, M.J., Vrancken, G., De Valdez G.F., De Vuyst, L. & Mozzi, F. (2012). Mannitol production by heterofermentative *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 and *Lactobacillus fermentum* CRL 573 in free and controlled pH batch fermentations. Applied Microbiology and Biotechnology 93: 2519–2527.
- Rodríguez, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M. & Medina, M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. International Dairy Journal 10(1): 7-15.
- Rodríguez, J.M., Horn, N., Dodd, H.M. & Martínez, M.I. (2003). Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 80(2): 101-116.
- Rogosa, M., Mitchell, J.A. & Wiseman, R.F. (1951). A selective for the isolation and enumeration of oral *Lactobacilli*. Journal of Dental Research 30(5): 682-689.
- Rönkä, E., Malinen, E., Saarela, M., Rinta-Koski, M., Aarnikunnas, J. & Palva, A. (2003). Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. International Journal of Food Microbiology 83(1): 63-74.
- Santos, R., Ramos, E., Zavaleta, A., Zuñiga, D. & Velezmoro, C. (2018). Production of riboflavin by lactic acid bacteria isolated from the manufacturing of “ tunta ”.

Ecología Aplicada 17(2).

- Sauer, M., Russmayer, H., Grabherr, R., Peterbauer, C.K. & Marx, H. (2017). The efficient clade: Lactic acid bacteria for industrial chemical production. *Trends in Biotechnology* 35(8):756-769.
- Savadogo, A; Ouattara, C.A.T., Savadogo, P.W., Barro, N., Ouattara, A.S. & Traoré, A.S. (2004). Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *African Journal of Biotechnology* 3(3):189-194.
- Silva, C.C.G., Silva, S.P.M. & Ribeiro, S.C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology* 9(1): 1-15.
- Silva, J., Carvalho, A.S., Teixeira, P. & Gibbs, P.A. (2002). Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 34(2): 77-81.
- Soda, E.M., Ahmed, N., Omran, N., Osman, G. & Morsi, A. (2003). Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheesemaking. *Emir. J. Food Agric* 15(2): 51-71.
- Son, S.H., Jeon, H.L., Yang, S.J., Lee, N.K. & Paik, H.D. (2017). In vitro characterization of *Lactobacillus brevis* KU15006, an isolate from kimchi, reveals anti-adhesion activity against foodborne pathogens and antidiabetic properties. *Microbial Pathogenesis* 112:135-141.
- Sowmya, N.S., Nandini, K., Earanna, N., Sajeevan, R.S. & Nataraja, K.N. (2016). Molecular identification and genetic diversity of lactobacillus species isolated from different edible sources. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 10(4):3155-3162
- Spencer, J.F.T., Ragout de Spencer, A.L., Cuozzo, S.A., Sesma, F.J.M., Holgado, A.A.P. de R. & Raya, R.R. (2003). Methods for the Detection and Concentration of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *Food Microbiology Protocols* 14(4):141-146.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B.M. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44(4):846-849.
- Sulmiyati., Said, N.S., Fahrodi, D.U., Malaka, R. & Maruddin, F. (2018). The characteristics of lactic acid bacteria isolated from Indonesian commercial kefir grain. *Malaysian*

Journal of Microbiology 14(7):632-639.

- Teixeira, P. (2014). *Lactobacillus: Lactobacillus brevis*. Encyclopedia of Food Microbiology 2: 418-424.
- Thokchom, S. & Joshi, S.R. (2012). Antibiotic Resistance and Probiotic Properties of Dominant Lactic Microflora from Tungrymbai, an Ethnic Fermented Soybean Food of India. The Journal of Microbiology 50(3): 535-539.
- Todorov, S.D., Stojanovski, S., Iliev, I., Moncheva, P., Nero, L.A. & Ivanova, I.V. (2017). Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian fermented meat product "lukanka". Brazilian Journal of Microbiology 48(3): 576-586.
- Tomás, M.S.J., Ocaña, V.S., Wiese, B. & Nader-Macías, M.E. (2003). Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. Journal of Medical Microbiology 52(12):1117-1124.
- Urbina, R.A. & Guerrero, K.R. (2018). Estudio preliminar de *Lactobacillus* sp, con potencial probiótico a partir de sustrato fermentado de yuca (*Manihot esculenta*), UNA 2017. Universidad Nacional Agraria. Managua-Nicaragua. Tesis.
- Vandenbergh, P.A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiology Reviews 12(1-3): 221-237.
- Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T. & Chikindas, M.L. (1998). Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. Journal of Applied Microbiology 84(6): 1131-1137.
- Vásquez, S.M., Suárez, H. & Zapata, S. (2009). Use of antimicrobial substances produced by acid lactic bacterias on meat conservation. Revista Chilena de Nutricion 36(1): 64-71.
- Vaz-velho, M., Fonseca, F., Silva, M. & Gibbs, P. (2001). Is *Listeria innocua* 2030c, a tetracycline-resistant strain, a suitable marker for replacing *L. monocytogenes* in challenge studies with cold-smoked fish? Food Control 12(6): 361-364.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. & Kreft, J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. Clinical Microbiology

Reviews 14(3): 584-640.

- Vázquez, C., Martín, A., De Siloníz, M. & Serrano, S. (2011). Técnicas básicas de microbiología. Observación de bacterias. REDUCA (Biología) 3(5): 15-38.
- Verlag, F., Aller, D.H., Olbus, H.C., Änzle, M.G.G., Cherenbacher, P.S., Ode, C.B. & Ammes, W.P.H. (2001). Metabolic and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria in the Gastro-intestinal Ecosystem: A comparative in vitro Study. Systematic and applied microbiology 226(24): 218-226.
- Versalovic, J; Koeth, T; Lupski, J.R. & Plaza, OB. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research 19(24):6823-6831.
- Vilca R. L. (2015). «Evaluacion de la concentracion de Penicillium en el tocosh de papa (*Solanum tuberosum* L.) de la variedad yungay en diferentes tiempos de fermentacion». Universidad Nacional de Huancavelica. Huancavelica-Perú. Tesis.
- Vodnar, D.C., Paucean, A., Dulf, F.V. & Socaciu, C. (2010). HPLC Characterization of Lactic Acid Formation and FTIR Fingerprint of Probiotic Bacteria during Fermentation Processes. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 38(1): 109-113.
- De Vuyst, L., Callewaert, R. & Crabbé, K. (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. Microbiology 142(4): 817-827.
- Wade, M.E., Strickland, M.T., Osborne, J.P. & Edwards, C.G. (2018). Role of *Pediococcus* in winemaking. Australian Journal of Grape and Wine Research 1.
- Wang, Y., Qin, Y., Xie, Q., Zhang, Y., Hu, J. & Li, P. (2018). Purification and characterization of Plantaricin LPL-1, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPL-1 isolated from fermented fish. Frontiers in Microbiology 9: 1-22.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173(2): 697-703.
- Woraprayote, W., Pumpuang, L., Tosukhowong, A., Roytrakul, S., Perez, R.H., Zendo, T., Sonomoto, K., Benjakul, S. & Visessanguan, W. (2015). Two putatively novel

- bacteriocins active against Gram-negative food borne pathogens produced by *Weissella hellenica* BCC 7293. *Food Control* 55: 176-184.
- Xie, Y., An, H., Hao, Y., Qin, Q., Huang, Y., Luo, Y. & Zhang, L. (2011). Characterization of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. *Food Control* 22(7):1 027-1031.
- Yaakoubi, K., Benkerroum, N., Wiorowski, F., Sanson, F., Haydersah, J. & Chevallier, I. (2009). Development of a multiwell antagonistic activity assay for the detection of bacteriocin production by lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 17: 32-45.
- Yang, Z. (2000). Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties. University of Helsinki. Helsinki-Finlandia. Tesis.
- Yépez, A., Luz, C., Meca, G., Vignolo, G., Mañes, J. & Aznar, R. (2017). Biopreservation potential of lactic acid bacteria from Andean fermented food of vegetal origin. *Food Control* 78:393-400.
- Zapata, S., Muñoz, J., Ruiz, O.S., Montoya, O.I. & Gutiérrez, P.A. (2009). Isolation of *Lactobacillus plantarum* LPBM10 and partial characterization of its bacteriocin. *Vitae* 16(1): 75-82.
- Zvietcovich, G. (1985). Inventario Tecnológico de los sistemas post cosecha en la sierra del Perú. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Ed. PISCA. Publicación Miscelánea IICA, Lima –Perú.
- Zvitov-Ya'ari, R. & Nussinovitch, A. (2014). Browning prevention in rehydrated freeze-dried non-blanché potato slices by electrical treatment. *LWT-Food Science and Technology* 56(1):194-199.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: A1. Medio de cultivo MRS

Composición y fórmula por litro de medio MRS.

Peptona de Caseína	10.0 g/L
Extracto de Carne	10.0 g/L
Extracto de Levadura	4.0 g/L
D-Glucosa	20.0 g/L
K ₂ HPO ₄	2.0 g/L
Twin 80	1.0 g/L
Diamonio de hidrogeno citrato	2.0 g/L
Acetato de Sodio	5.0 g/L
Sulfato de Magnesio	0.2 g/L
Sulfato de Manganeso	0.04 g/L
Agar	14.0 g/L
pH	5.7 ± 0.2

Anexo 2: A2. Medio de cultivo TSA

Composición y fórmula por litro de medio TSA enriquecido con extracto de levadura.

Tripeína	15.0 g/L
Peptona de Soya	5.0 g/L
Extracto de Levadura	5.0 g/L
Cloruro de Sodio	5.0 g/L
Agar / Agar blando	15.0 g/L / 7.0 g/L
pH	7.3 ± 0.2

Anexo 3: A3. Medio de cultivo TSB

Composición y fórmula por litro de medio TSB enriquecido con extracto de levadura.

Tripeína	17.0 g/L
Peptona de Soya	3.0 g/L
Dextrosa	2.5 g/L
Extracto de Levadura	5.0 g/L
Cloruro de Sodio	5.0 g/L
Fosfato de hidrógeno dipotásico	2.5 g/L
pH	7.3 ± 0.2

Anexo 4: B4. Pruebas bioquímicas y actividad antagonica de BAL aisladas provenientes de Tocosh frente a *L. innocua*.

Pruebas bioquímicas

- : Reacción negativa
- + : Reacción positiva

Observación Microscópica

- (+) : Un poco más grande de lo normal
- (-) : Un poco más pequeño de lo normal

Prueba de antagonismo de cepas BAL frente a *L. innocua*

- + : Presencia de halo
- : No presencia de halo

Caja1 (grupo 40)

N°	Nueva codificación de cepas BAL	Pruebas bioquímicas			Prueba de antagonismo frente a <i>L. innocua</i>
		Observación Microscópica	Catalasa	KOH	Halo de inhibición
1	2TH01-BL01	Bacilos normales(+)	-	-	-
2	2TH01-BL02	Bacilos normales(-)	-	-	-
3	2TH18-BL01	Bacilos normales	-	-	-
4	2TH09-BL12	Bacilos normales(-)	-	-	-
5	2TH09-BL13	Bacilos normales	-	-	-
6	2TH09-BL14	Bacilos normales	-	-	-
7	2TH03-BL02	Bacilos normales	-	-	-
8	2TH09-BL18	Bacilos normales	-	-	-
9	2TH09-BL17	Bacilos normales	-	-	-
10	2TH01-BL03	Bacilos normales(-)	-	-	-
11	2TH02-BL05	Bacilos normales	-	-	-

Continuación...

12	2TH03-BL01	Bacilos normales	-	-	-
13	2TH09-BL06	Bacilos normales	-	-	-
14	2TH09-BL07	Bacilos normales(-)	-	-	-
15	2TH09-BL08	Bacilos normales	-	-	-
16	2TH09-BL09	Bacilos normales	-	-	-
17	2TH09-BL10	Bacilos normales(-)	-	-	-
18	2TH09-BL11	Bacilos normales(+)	-	-	-
19	2TH19-BL15	Bacilos normales	-	-	-
20	2TH08-BL08	Bacilos normales	-	-	-
21	2TH16-BL33	Bacilos normales	-	-	-
22	2TH17-BL06	Bacilos normales	-	-	-
23	2TH12-BL16	Bacilos normales(+)	-	-	-
24	2TH03-BL03	Bacilos normales	-	-	-
25	2TH04-BL02	Bacilos normales delgados	-	-	-
26	2TH02-BL04	Bacilos normales	-	-	-
27	2TH03-BL04	Bacilos normales(-)	-	-	-
28	2TH15-BL22	Bacilos normales	-	-	-
29	2TH15-BL24	Bacilos normales(+)	-	-	-
30	2TH15-BL21	Bacilos normales(+)	-	-	-
31	2TH15-BL25	Bacilos normales	-	-	-
32	2TH15-BL23	Bacilos normales(-)	-	-	-
33	2TH17-BL03	Bacilos normales	-	-	-
34	2TH15-BL20	Bacilos normales(+) delgados	-	-	-

Continuación...

35	2TH17-BL07	Bacilos normales grueso	-	-	-
36	2TH15-BL26	Bacilos normales	-	-	-
37	2TH09-BL30	Bacilos normales grueso(-)	-	-	-
38	2TH09-BL29	Bacilos normales	-	-	-
39	2TH09-BL28	Bacilos normales	-	-	-
40	2TH07-BL04	Bacilos normales	-	-	-

Caja 2 (grupo 40)

N°	Nueva codificación de cepas BAL	Pruebas bioquímicas			Prueba de antagonismo frente a <i>L. innocua</i>
		Observación Microscópica	Catalasa	KOH	Halo de inhibición
1	2TH08-BL07	Cocobacilos	-	-	-
2	2TH15-BL04	Cocobacilos	-	-	-
3	2TH15-BL15	Cocobacilos	-	-	-
4	2TH15-BL13	Bacilos normales	-	-	-
5	2TH16-BL22	Bacilos normales	-	-	-
6	2TH15-BL18	Cocobacilos (+)	-	-	-
7	2TH15-BL12	Cocobacilos (-)	-	-	-
8	2TH15-BL11	Bacilos cortos	-	-	-
9	2TH08-BL05	Coco	-	-	-
10	2TH16-BL17	Cocobacilos	-	-	-
11	2TH15-BL16	Bacilos cortos	-	-	-
12	2TH15-BL14	Cocobacilos	-	-	-
13	2TH16-BL06	Cocobacilos	-	-	-
14	2TH16-BL04	Cocobacilos (+)	-	-	-
15	2TH16-BL14	Cocobacilos (-)	-	-	-
16	2TH17-BL01	Bacilos normales(+)	-	-	-
17	2TH01-BL05	Cocobacilos	-	-	-

Continuación...

18	2TH16-BL05	Cocos	-	-	-
19	2TH17-BL02	Cocobacilos	-	-	-
20	2TH16-BL07	Cocos (+)	-	-	-
21	2TH16-BL20	Bacilos normales gruesos	-	-	-
22	2TH05-BL02	Bacilos normales(+) delgado	-	-	-
23	2TH16-BL09	Bacilos curvos	-	-	-
24	2TH11-BL01	Cocobacilos	-	-	-
25	2TH16-BL10	Cocobacilos (-)	-	-	-
26	2TH15-BL03	Bacilos largos delgados	-	-	-
27	2TH16-BL16	Bacilos curvos	-	-	-
28	2TH05-BL01	Bacilos normales gruesos	-	-	-
29	2TH15-BL01	Cocos pequeños	-	-	-
30	2TH16-BL12	Cocobacilos	-	-	-
31	2TH16-BL11	Cocos pequeños	-	-	-
32	2TH16-BL15	Cocobacilos	-	-	-
33	2TH16-BL13	Bacilos cortos	-	-	-
34	2TH13-BL11	Bacilos cortos	-	-	-
35	2TH16-BL03	Bacilos normales	-	-	-
36	2TH16-BL08	Bacilos normales(+) delgado	-	-	-
37	2TH15-BL02	Cocobacilos	-	-	-
38	2TH13-BL12	Cocobacilos	-	-	-
39	2TH01-BL04	Bacilos normales gruesos	-	-	-
40	2TH01-BL06	Bacilos normales	-	-	-

Caja 3 (grupo 80)

N°	Nueva codificación de cepas BAL	Pruebas bioquímicas			Prueba de antagonismo frente a <i>L. innocua</i>
		Observación Microscópica	Catalasa	KOH	Halo de inhibición
1	2TH09-BL59	Bacilos normales	-	-	-
2	2TH01-BL23	Cocobacilo	-	-	-
3	2TH08-BL18	Bacilos normales	-	-	-
4	2TH03-BL12	Bacilos cortos	-	-	+
5	2TH12-BL19	Cocobacilo	-	-	-
6	2TH18-BL19	Bacilo	-	-	-
7	2TH18-BL21	Coco	-	-	-
8	2TH09-BL65	Bacilo	-	-	-
9	2TH18-BL42	Bacilo	-	-	-
10	2TH02-BL13	Cocobacilo	-	-	-
11	2TH13-BL54	Bacilo (-)	-	-	-
12	2TH05-BL14	coco	-	-	-
13	2TH03-BL13	Bacilos cortos	-	-	+
14	2TH16-BL38	Bacilo	-	-	-
15	2TH18-BL16	Bacilo	-	-	-
16	2TH18-BL26	Bacilo	-	-	-
17	2TH07-BL19	Bacilo	-	-	-
18	2TH18-BL40	Bacilo	-	-	-
19	2TH02-BL14	Cocobacilo	-	-	-
20	2TH02-BL15	Bacilos cortos	-	-	-
21	2TH08-BL19	Bacilo (+)	-	-	-
22	2TH18-BL34	Cocobacilo	-	-	-
23	2TH18-BL12	Bacilo	-	-	-
24	2TH18-BL17	Bacilo	-	-	-
25	2TH18-BL23	Bacilo	-	-	-
26	2TH07-BL18	cocobacilo	-	-	-
27	2TH13-BL53	Bacilo (-)	-	-	-
28	2TH09-BL60	Bacilo	-	-	-
29	2TH16-BL67	Bacilo	-	-	-
30	2TH18-BL28	Cocobacilo	-	-	-
31	2TH18-BL31	Bacilo	-	-	-
32	2TH18-BL33	Bacilo	-	-	-
33	2TH18-BL18	Bacilos cortos	-	-	-
34	2TH18-BL41	Bacilo curvo	-	-	-
35	2TH09-BL61	Bacilo	-	-	-
36	2TH08-BL15	Bacilo	-	-	-

Continuación...

37	2TH07-BL16	Bacilo	-	-	-
38	2TH18-BL29	Bacilos cortos	-	-	-
39	2TH18-BL38	Bacilo	-	-	-
40	2TH18-BL27	Bacilo	-	-	-
41	2TH18-BL15	Bacilos cortos	-	-	-
42	2TH01-BL24	Bacilo (-)	-	-	-
43	2TH16-BL65	Bacilo (-)	-	-	-
44	2TH01-BL22	Bacilo	-	-	-
45	2TH09-BL63	Bacilos cortos	-	-	-
46	2TH13-BL40	Bacilo	-	-	-
47	2TH18-BL35	Bacilo	-	-	-
48	2TH18-BL11	Bacilo	-	-	-
49	2TH16-BL65	Bacilo (-)	-	-	-
50	2TH18-BL24	Bacilo	-	-	-
51	2TH18-BL14	Bacilo	-	-	-
52	2TH18-BL39	Bacilo	-	-	-
53	2TH15-BL54	Cocobacilo	-	-	-
54	2TH09-BL62	Bacilo	-	-	-
55	2TH09-BL64	Bacilos cortos	-	-	-
56	2TH16-BL64	Bacilo	-	-	-
57	2TH18-BL36	Bacilos cortos	-	-	-
58	2TH18-BL32	Bacilo	-	-	-
59	2TH18-BL25	Bacilo	-	-	-
60	2TH18-BL22	Bacilo	-	-	-
61	2TH12-BL21	Bacilo	-	-	-
62	2TH15-BL52	Cocobacilo	-	-	-
63	2TH07-BL14	Bacilo (-)	-	-	-
64	2TH08-BL17	Bacilo	-	-	-
65	2TH07-BL17	Bacilo	-	-	-
66	2TH18-BL37	Bacilo	-	-	-
67	2TH18-BL30	Bacilo	-	-	-
68	2TH17-BL15	Bacilo	-	-	-
69	2TH09-BL66	Bacilos cortos	-	-	-
70	2TH18-BL43	Bacilo	-	-	-
71	2TH15-BL53	Cocobacilo	-	-	-
72	2TH07-BL15	Bacilo normal	-	-	-
73	2TH08-BL16	Bacilo	-	-	-
74	2TH13-BL46	Bacilo (-)	-	-	-
75	2TH12-BL18	Coco	-	-	-
76	2TH18-BL13	Bacilo	-	-	-
77	2TH18-BL20	Coco	-	-	-
78	2TH17-BL16	Bacilos cortos	-	-	-
79	2TH07-BL13	Bacilo	-	-	-
80	2TH16-BL66	Bacilo	-	-	-

Caja 4 (grupo 67)

N°	Nueva codificación de cepas BAL	Pruebas bioquímicas			Prueba de antagonismo frente a <i>L. innocua</i>
		Observación Microscópica	Catalasa	KOH	Halo de inhibición
1	2TH16-BL47	Bacilo normal	-	-	-
2	2TH16-BL43	Bacilo normal	-	-	-
3	2TH16-BL49	Bacilos normal	-	-	-
4	2TH16-BL46	Bacilo normal	-	-	-
5	2TH16-BL44	Bacilos corto	-	-	-
6	2TH16-BL51	Bacilo normal	-	-	-
7	2TH16-BL50	Bacilos normal	-	-	-
8	2TH16-BL48	Bacilos normal	-	-	-
9	2TH16-BL41	Bacilos normal	-	-	-
10	2TH15-BL46	Bacilo normal delgado	-	-	-
11	2TH15-BL43	Bacilo normal	-	-	-
12	2TH15-BL47	Bacilo normal	-	-	-
13	2TH15-BL48	Bacilo normal	-	-	-
14	2TH15-BL49	Bacilo normal	-	-	-
15	2TH16-BL39	Bacilo normal	-	-	-
16	2TH13-BL41	Bacilo normal (-)	-	-	-
17	2TH15-BL45	Bacilo normal	-	-	-
18	2TH16-BL40	Bacilo normal	-	-	-
19	2TH16-BL57	Bacilo normal	-	-	-
20	2TH16-BL56	Bacilo normal	-	-	-
21	2TH16-BL55	Bacilos normal	-	-	-
22	2TH16-BL53	Bacilo grueso	-	-	-
23	2TH16-BL54	Bacilo normal	-	-	-
24	2TH16-BL52	Bacilo normal	-	-	-
25	2TH12-BL20	Bacilo	-	-	-
26	2TH16-BL45	Bacilo	-	-	-
27	2TH16-BL42	Bacilo normal	-	-	-
28	2TH16-BL60	Bacilo normal	-	-	-
29	2TH08-BL20	Bacilo normal	-	-	-
30	2TH16-BL59	Bacilo normal	-	-	-

Continuación...

31	2TH13-BL43	Bacilo normal	-	-	-
32	2TH13-BL42	Coco	-	-	-
33	2TH15-BL51	Bacilo normal delgado	-	-	-
34	2TH15-BL50	Bacilo normal	-	-	-
35	2TH15-BL54	Cocobacilo	-	-	-
36	2TH16-BL58	Bacilo normal	-	-	-
37	2TH09-BL69	Bacilo normal (-)	-	-	-
38	2TH02-BL17	Coco	-	-	-
39	2TH02-BL20	Bacilos normal (-)	-	-	-
40	2TH03-BL14	Bacilo normal	-	-	-
41	2TH13-BL50	Bacilo normal	-	-	-
42	2TH05-BL16	Bacilo normal(-)	-	-	-
43	2TH03-BL17	Bacilo normal	-	-	-
44	2TH13-BL44	Bacilo normal	-	-	-
45	2TH16-BL61	Bacilo curvo y bacilo normal	-	-	-
46	2TH05-BL18	Bacilo normal	-	-	-
47	2TH02-BL18	Coco	-	-	-
48	2TH13-BL51	Bacilo normal (-)	-	-	-
49	2TH13-BL48	Bacilo normal (-)	-	-	-
50	2TH09-BL68	Bacilo normal (-)	-	-	-
51	2TH02-BL16	Coco	-	-	-
52	2TH03-BL15	Bacilo normal	-	-	-
53	2TH02-BL19	Coco	-	-	-
54	2TH05-BL21	Cocobacilo	-	-	-
55	2TH06-BL67	Bacilos cortos (+)	-	-	-
56	2TH13-BL55	Bacilo normal (-)	-	-	-
57	2TH02-BL22	Cocobacilo	-	-	-
58	2TH03-BL16	Bacilo normal	-	-	-
59	2TH02-BL21	Bacilo normal (-)	-	-	-
60	2TH03-BL20	Bacilo curvo y coco	-	-	-
61	2TH03-BL19	Bacilo normal (-)	-	-	-

Continuación...

62	2TH05-BL17	Bacilo normal	-	-	-
63	2TH13-BL47	Bacilo normal	-	-	-
64	2TH05-BL22	Bacilo normal (-)	-	-	-
65	2TH05-BL23	Bacilo normal	-	-	-
66	2TH04-BL05	Cocobacilo	-	-	-
67	2TH15-BL55	Cocobacilo	-	-	-

Caja 5 (grupo 80)

N°	Nueva codificación de cepas BAL	Pruebas bioquímicas			Prueba de antagonismo frente a <i>L. innocua</i>
		Observación Microscópica	Catalasa	KOH	Halo de inhibición
1	2TH13-BL52	Bacilo normal	-	-	-
2	2TH03-BL23	Bacilo normal (-)	-	-	-
3	2TH05-BL13	Bacilos cortos	-	-	-
4	2TH09-BL54	Bacilo normal	-	-	-
5	2TH09-BL55	Bacilos cortos	-	-	-
6	2TH13-BL35	Bacilo normal	-	-	-
7	2TH13-BL37	Bacilo normal	-	-	-
8	2TH08-BL14	Bacilo normal	-	-	-
9	2TH02-BL17	Coco	-	-	-
10	2TH03-BL22	Bacilo normal	-	-	-
11	2TH09-BL70	Bacilo normal grueso	-	-	-
12	2TH05-BL10	Bacilo normal	-	-	-
13	2TH14-BL05	Bacilo normal	-	-	-
14	2TH13-BL36	Bacilo normal	-	-	-
15	2TH13-BL36	Bacilo normal	-	-	-
16	2TH13-BL34	Bacilo normal	-	-	-
17	2TH07-BL16	Bacilo normal	-	-	-
18	2TH02-BL16	Coco	-	-	-
19	2TH03-BL18	Cocobacilos	-	-	-
20	2TH09-BL71	Bacilo normal	-	-	-
21	2TH13-BL39	cocobacilo	-	-	-
22	2TH13-BL30	Cocobacilos	-	-	-
23	2TH16-BL36	Bacilos cortos	-	-	-
24	2TH05-BL11	Bacilos cortos	-	-	-
25	2TH13-BL33	Bacilos cortos	-	-	-
26	2TH03-BL15	Cocobacilo	-	-	-
27	2TH02-BL15	Bacilos cortos	-	-	-

Continuación...

28	2TH13-BL47	Bacilo normal	-	-	-
29	2TH08-BL21	Cocobacilo	-	-	-
30	2TH09-BL52	Cocobacilo	-	-	-
31	2TH13-BL31	Cocobacilo	-	-	-
32	2TH14-BL06	Bacilo normal	-	-	-
33	2TH05-BL09	Bacilo normal	-	-	-
34	2TH13-BL32	Bacilos cortos	-	-	-
35	2TH03-BL14	Bacilo normal	-	-	-
36	2TH02-BL14	Cocobacilo	-	-	-
37	2TH05-BL15	Coco	-	-	-
38	2TH16-BL62	Bacilo normal	-	-	-
39	2TH13-BL34	Bacilo normal	-	-	-
40	2TH13-BL32	Bacilos cortos	-	-	-
41	2TH18-BL10	Bacilos cortos	-	-	-
42	2TH05-BL12	Cocobacilo	-	-	-
43	2TH13-BL31	Cocobacilo	-	-	-
44	2TH03-BL13	Coco	-	-	-
45	2TH02-BL13	Cocobacilo	-	-	-
46	2TH05-BL19	Bacilo normal	-	-	-
47	2TH03-BL17	Bacilo normal	-	-	-
48	2TH13-BL37	Bacilo normal	-	-	-
49	2TH12-BL17	Cocobacilo	-	-	-
50	2TH15-BL42	Bacilos cortos	-	-	-
51	2TH13-BL30	Cocobacilo	-	-	-
52	2TH03-BL12	Bacilos cortos	-	-	-
53	2TH01-BL25	Bacilo normal (-)	-	-	-
54	2TH05-BL20	Bacilo normal	-	-	-
55	2TH16-BL35	Bacilos cortos	-	-	-
56	2TH13-BL35	Bacilo normal	-	-	-
57	2TH17-BL14	Coco	-	-	-
58	2TH12-BL17	Cocobacilo	-	-	-
59	2TH03-BL11	Bacilo normal	-	-	-
60	2TH09-BL53	Cocobacilo	-	-	-
61	2TH03-BL11	Bacilo normal	-	-	-
62	2TH01-BL24	Bacilo normal (-)	-	-	-
63	2TH13-BL49	Bacilo normal (-)	-	-	-
64	2TH08-BL14	Bacilo normal	-	-	-
65	2TH13-BL38	Bacilos cortos	-	-	-
66	2TH09-BL57	Bacilos cortos	-	-	-
67	2TH13-BL39	Cocobacilo	-	-	-
68	2TH05-BL08	Bacilos cortos	-	-	-
69	2TH09-BL52	Cocobacilo	-	-	-

Continuación...

70	2TH02-BL18	Coco	-	-	-
71	2TH01-BL23	Cocobacilo	-	-	-
72	2TH03-BL21	Bacilo normal (-)	-	-	-
73	2TH09-BL58	Bacilo normal	-	-	-
74	2TH13-BL33	Bacilos cortos	-	-	-
75	2TH09-BL56	Bacilo normal	-	-	-
76	2TH13-BL38	Bacilos cortos	-	-	-
77	2TH09-BL53	Cocobacilo	-	-	-
78	2TH08-BL15	Bacilo normal	-	-	-
79	2TH02-BL19	Coco	-	-	-
80	2TH01-BL22	Bacilo normal	-	-	-

Caja 6 (grupo 60)

N°	Nueva codificación de cepas BAL	Pruebas bioquímicas			Prueba de antagonismo frente a <i>L. innocua</i>
		Observación Microscópica	Catalasa	KOH	Halo de inhibición
1	2TH15-BL57	Bacilo normal (-)	-	-	-
2	2TH09-BL72	Bacilo normal (-)	-	-	-
3	2TH15-BL58	Bacilo normal	-	-	-
4	2TH15-BL59	Bacilo normal (-)	-	-	-
5	2TH16-BL63	Bacilo normal	-	-	-
6	2TH13-BL56	Bacilo normal	-	-	-
7	2TH08-BL25	Cocobacilo	-	-	-
8	2TH08-BL22	Bacilo normal (-)	-	-	-
9	2TH07-BL27	Coco	-	-	-
10	2TH07-BL26	Coco	-	-	-
11	2TH08-BL24	Bacilo normal (-)	-	-	-
12	2TH13-BL64	Bacilo normal (-)	-	-	-
13	2TH03-BL25	Bacilo normal (-)	-	-	-
14	2TH08-BL26	Bacilo normal (-)	-	-	-
15	2TH09-BL74	Bacilo normal (-)	-	-	-
16	2TH03-BL26	Cocobacilo	-	-	-
17	2TH13-BL59	Bacilo normal (-)	-	-	-

Continuación...

18	2TH13-BL57	Bacilo normal (-)	-	-	-
19	2TH13-BL58	Bacilo normal	-	-	-
20	2TH13-BL61	Bacilo normal	-	-	-
21	2TH08-BL27	Bacilo normal	-	-	-
22	2TH13-BL60	Bacilo normal (-)	-	-	-
23	2TH13-BL62	Bacilo normal (-)	-	-	-
24	2TH04-BL06	Bacilo normal (-)	-	-	-
25	2TH13-BL63	Bacilo normal (+)	-	-	-
26	2TH08-BL28	Bacilo normal	-	-	-
27	2TH07-BL22	Bacilo normal	-	-	-
28	2TH09-BL73	Bacilo normal (-)	-	-	-
29	2TH08-BL29	Bacilo normal (-)	-	-	-
30	2TH03-BL27	Bacilo normal (-)	-	-	-
31	2TH01-BL27	Coco	-	-	-
32	2TH07-BL28	Coco	-	-	-
33	2TH01-BL26	Bacilo normal	-	-	-
34	2TH09-BL76	Coco (-)	-	-	-
35	2TH08-BL23	Bacilo (-)	-	-	-
36	2TH09-BL75	Cocobacilo	-	-	-
37	2TH07-BL24	Coco	-	-	-
38	2TH07-BL23	Coco	-	-	-
39	2TH03-BL24	Bacilo normal (-)	-	-	-
40	2TH07-BL21	Cocobacilo	-	-	-
41	2TH08-BL30	Cocobacilo	-	-	-
42	2TH09-BL77	Cocobacilo	-	-	-
43	2TH01-BL25	Bacilo normal (-)	-	-	-
44	2TH15-BL56	Bacilo normal	-	-	-
45	2TH07-BL20	Cocobacilo	-	-	-
46	2TH07-BL25	Coco	-	-	-
47	2TH04-BL25	Bacilo normal	-	-	-
48	2TH09-BL79	Bacilo normal (-)	-	-	-
49	2TH08-BL32	Bacilo normal (-)	-	-	-
50	2TH07-BL29	Cocobacilo	-	-	-
51	2TH09-BL80	Cocobacilo	-	-	-
52	2TH09-BL78	Cocobacilo	-	-	-
53	2TH03-BL28	Bacilo normal (-)	-	-	-

Continuación...

54	2TH13-BL76	Cocobacilos	-	-	-
55	2TH09-BL81	Bacilo normal	-	-	-
56	2TH09-BL83	Bacilo normal (-)	-	-	-
57	2TH09-BL84	Bacilo normal (-)	-	-	-
58	2TH09-BL82	Bacilo normal	-	-	-
59	2TH03-BL29	Bacilo normal	-	-	-
60	2TH03-BL30	Bacilo normal (-)	-	-	-

Caja 7 (grupo 22)

N°	Nueva codificación de cepas BAL	Pruebas bioquímicas			Prueba de antagonismo frente a <i>L. innocua</i>
		Observación Microscópica	Catalasa	KOH	Halo de inhibición
1	2TH13-BL73	Bacilos cortos	-	-	-
2	2TH13-BL69	Bacilo normal (-)	-	-	-
3	2TH13-BL78	Bacilos cortos	-	-	-
4	2TH13-BL74	Bacilos cortos	-	-	-
5	2TH02-BL28	Bacilo normal (-) grueso	-	-	-
6	2TH09-BL89	Bacilos cortos (-) grueso	-	-	-
7	2TH13-BL70	Bacilos cortos grueso	-	-	-
8	2TH09-BL90	Bacilos cortos (-) grueso	-	-	-
9	2TH13-BL71	Bacilo normal (-) grueso	-	-	-
10	2TH13-BL81	Bacilos normal	-	-	-
11	2TH13-BL77	Bacilo normal (-)	-	-	-
12	2TH13-BL86	Bacilos cortos	-	-	-
13	2TH13-BL84	Bacilos cortos	-	-	-
14	2TH13-BL79	Bacilos cortos	-	-	-
15	2TH13-BL75	Bacilos cortos	-	-	-
16	2TH13-BL80	Bacilos cortos	-	-	-
17	2TH13-BL83	Bacilos cortos	-	-	-
18	2TH13-BL88	Coco	-	-	-
19	2TH13-BL82	Bacilos cortos	-	-	-
20	2TH13-BL72	Bacilos cortos	-	-	-

Continuación...

21	2TH13-BL76	Bacilos cortos	-	-	-
22	2TH13-BL85	Bacilos cortos	-	-	-

Caja 8 (grupo 53)

N°	Nueva codificación de cepas BAL	Pruebas bioquímicas			Prueba de antagonismo frente a <i>L. innocua</i>
		Observación Microscópica	Catalasa	KOH	Halo de inhibición
1	2TH02-BL23	Bacilos cortos (-)	-	-	-
2	2TH18-BL44	Bacilos cortos	-	-	-
3	2TH14-BL07	Bacilos cortos	-	-	-
4	2TH14-BL08	Bacilo normal (-)	-	-	-
5	2TH15-BL61	Cocobacilo	-	-	-
6	2TH17-BL17	Cocobacilo	-	-	-
7	2TH13-BL65	Bacilos cortos	-	-	-
8	2TH17-BL19	Bacilo normal (-)	-	-	-
9	2TH07-BL30	Cocobacilo	-	-	-
10	2TH15-BL60	Cocobacilo grueso	-	-	-
11	2TH17-BL18	Bacilos cortos	-	-	-
12	2TH18-BL45	Bacilo normal (-)	-	-	-
13	2TH08-BL31	Bacilos cortos	-	-	-
14	2TH01-BL28	Bacilos cortos	-	-	-
15	2TH09-BL88	Bacilos cortos	-	-	-
16	2TH05-BL24	Bacilo normal (-)	-	-	-
17	2TH13-BL68	Bacilos cortos	-	-	-
18	2TH09-BL87	Cocobacilo	-	-	-
19	2TH19-BL53	Bacilo normal	-	-	-
20	2TH11-BL03	Bacilo normal (-)	-	-	-
21	2TH02-BL25	Bacilo normal (-)	-	-	-
22	2TH18-BL52	Bacilo normal y Bacilo curvo	-	-	-
23	2TH18-BL49	Bacilo normal y Bacilo curvo	-	-	-
24	2TH18-BL50	Bacilos cortos	-	-	-

Continuación...

25	2TH01-BL29	Bacilo normal	-	-	-
26	2TH01-BL30	Bacilo normal	-	-	-
27	2TH02-BL26	Bacilo normal (-)	-	-	-
28	2TH02-BL27	Bacilo normal	-	-	-
29	2TH04-BL07	Bacilo normal (-)	-	-	-
30	2TH03-BL31	Coco	-	-	-
31	2TH04-BL08	Cocobacilo	-	-	-
32	2TH08-BL33	Cocobacilo	-	-	-
33	2TH15-BL62	Cocobacilo	-	-	-
34	2TH18-BL48	Bacilo normal (-)	-	-	-
35	2TH08-BL34	Cocobacilo	-	-	-
36	2TH17-BL20	Bacilo normal (-)	-	-	-
37	2TH08-BL36	Cocobacilo	-	-	-
38	2TH09-BL85	Bacilo normal	-	-	-
39	2TH13-BL67	Bacilo normal (-)	-	-	-
40	2TH09-BL86	Bacilo normal (-)	-	-	-
41	2TH03-BL32	Bacilo normal (-)	-	-	-
42	2TH05-BL25	Bacilo normal (-)	-	-	-
43	2TH08-BL37	Bacilo normal	-	-	-
44	2TH08-BL35	Cocobacilo	-	-	-
45	2TH18-BL51	Bacilo normal y Bacilo curvo	-	-	-
46	2TH05-BL26	Cocobacilo	-	-	-
47	2TH13-BL87	Bacilo normal y Bacilo curvo	-	-	-
48	2TH11-BL02	Bacilo normal	-	-	-
49	2TH18-BL54	Bacilo normal (-) grueso	-	-	-
50	2TH18-BL47	Bacilo normal (-) y Bacilo curvo	-	-	-
51	2TH08-BL38	Bacilo normal grueso	-	-	-
52	2TH02-BL24	Bacilo normal (-)	-	-	-
53	2TH18-BL46	Cocobacilo	-	-	-

Anexo 5: B5. Caracterización fisiológica de 2TH03-BL12 y 2TH03-BL13 mediante dinámica de crecimiento en caldo MRS a 28 °C.

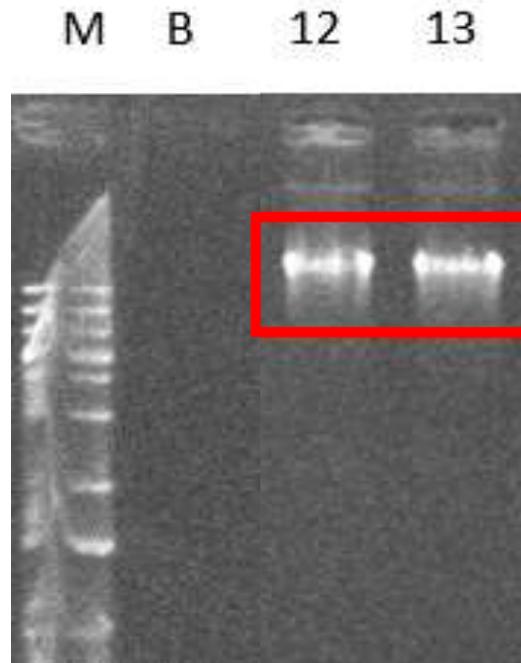
Tiempo (h)	2TH03-BL12		2TH03-BL13	
	UFC/ml	pH	UFC/ml	pH
0	6.24E+06	5.85 ± 0.00	4.00E+07	5.81 ± 0.03
2	1.13E+07	5.82 ± 0.01	7.60E+07	5.72 ± 0.01
6	1.13E+08	5.62 ± 0.01	2.46E+08	5.39 ± 0.02
9	2.82E+08	5.16 ± 0.02	4.16E+08	4.98 ± 0.03
12	2.91E+08	4.92 ± 0.01	1.19E+09	4.6 ± 0.03
17	3.36E+08	4.77 ± 0.01	1.59E+09	4.15 ± 0.03
24	3.60E+08	4.62 ± 0.01	3.30E+09	3.94 ± 0.01
48	3.68E+08	4.36 ± 0.01	3.73E+09	4.11 ± 0.01
79	-	4.07 ± 0.03	-	4.22 ± 0.06
99	8.09E+07	4.04 ± 0.04	6.33E+08	4.32 ± 0.06

Tiempo (h)	2TH03-BL12			2TH03-BL13		
	UFC/ml	pH	Halo (mm)	UFC/ml	pH	Halo (mm)
0	5.18E+07	5.45 ± 0.08	23.725 ± 0.04	4.01E+07	5.45 ± 0.08	25.06 ± 0.13
6	3.64E+08	5.22 ± 0.03	24.72 ± 0.28	3.05E+08	5.14 ± 0.13	27.48 ± 0.66
12	4.45E+08	4.92 ± 0.08	27.975 ± 0.26	4.69E+08	4.66 ± 0.31	27.75 ± 0.34
24	4.92E+08	4.71 ± 0.12	26.13 ± 0.04	6.10E+08	3.96 ± 0.06	29.56 ± 0.23
48	4.90E+08	4.53 ± 0.07	20.145 ± 0.16	5.21E+08	4.12 ± 0.05	29.97 ± 0.01

Anexo 6: B6. Calidad de extracción de ADN mediante Nanodrop.

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	260/230
2TH03-BL12	40.1	ng/μl	1.85	2.04
2TH03-BL12	39.6	ng/μl	1.83	1.96
2TH03-BL13	79.9	ng/μl	1.81	1.75
2TH03-BL13	82.1	ng/μl	1.77	1.70

Anexo 7: C7. Calidad de ADN por electroforesis

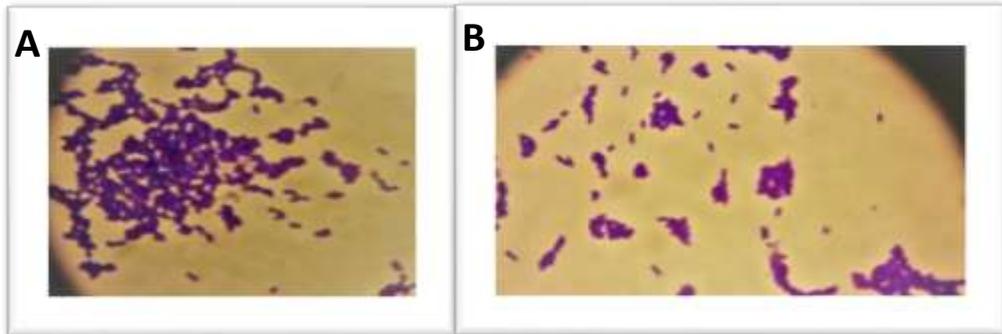


Corrida electroforética de ADN calidad de dos bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica frente a *Listeria innocua*. Marcador de peso molecular (M), banco (B), cepa: 2TP03-BL12 (12), cepa:2TP03-BL13 (13), Bandas de ADN en la cuadrícula roja.

Anexo 8: C8. Tinción simple



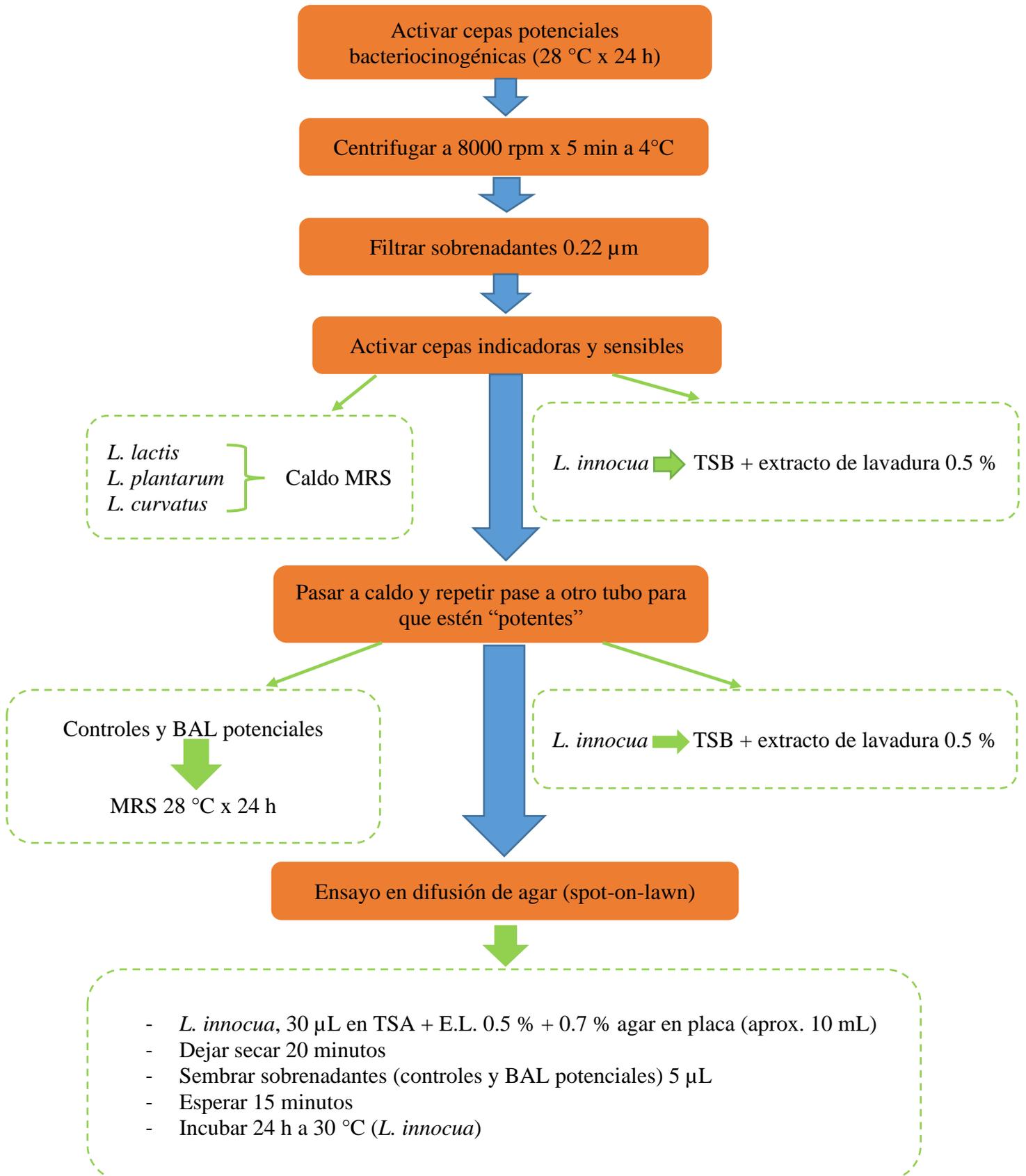
Anexo 9: C9. Observación microscópica 1000X de las cepas (A) 2TH03-BL12 Y (B) 2TH03-BL13. Presentando ambas forma bacilar y Gram positivas.



Anexo 10: C10. Ensayo en pozo dilución crítica. 1/1, 1/4, 1/16, 1/64.



Anexo 11: C11. Proceso de obtención de sustancias antagónicas



Anexo 12: D12. ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa 2TH03-BL12 por ensayo

Resumen Estadístico para Halo de inhibición (mm)

Ensayo	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
Control	3	33.4033	0.602107	1.80254%	32.73	33.89
Neutralizado	3	32.1967	0.989966	3.07475%	31.06	32.87
Catalasa	3	32.6967	0.190351	0.582171%	32.5	32.88
Total	9	32.7656	0.787641	2.40387%	31.06	33.89

Tabla ANOVA para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.20542	2	1.10271	2.40	0.1715
Intra grupos	2.7576	6	0.4596		
Total (Corr.)	4.96302	8			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halo de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 2.39928, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halo de inhibición (mm) entre un nivel de Ensayo y otro, con un nivel del 5% de significación.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Método: 95.0 porcentaje LSD

Ensayo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Neutralizado	3	32.1967	X
Catalasa	3	32.6967	X
Control	3	33.4033	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Catalasa - Control		-0.706667	1.35445
Catalasa - Neutralizado		0.5	1.35445
Control - Neutralizado		1.20667	1.35445

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Anexo 13: D3. ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa 2TH03-BL13 por ensayo

Resumen Estadístico para Halo de inhibición (mm)

Ensayo	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo
Control	3	31.74	1.6087	5.06835%	30.67	33.59
Neutralizado	3	31.1333	0.496521	1.59482%	30.58	31.54
Catalasa	3	30.71	0.69217	2.25389%	30.21	31.5
Total	9	31.1944	1.01459	3.25249%	30.21	33.59

Tabla ANOVA para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.60816	2	0.804078	0.73	0.5211
Intra grupos	6.62707	6	1.10451		
Total (Corr.)	8.23522	8			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halo de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0.727994, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halo de inhibición (mm) entre un nivel de Ensayo y otro, con un nivel del 5% de significación.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Método: 95.0 porcentaje LSD

Ensayo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Catalasa	3	30.71	X
Neutralizado	3	31.1333	X
Control	3	31.74	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Catalasa - Control		-1.03	2.09971
Catalasa - Neutralizado		-0.423333	2.09971
Control - Neutralizado		0.606667	2.09971

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Anexo 14: D4. ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa 2TH03-BL12 por temperatura

Resumen Estadístico para Halo de inhibición (mm)

Tabla ANOVA para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Ensayo	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
100°C 10 min	3	31.6933	0.0503322	31.64	31.74
70°C 10 min	3	31.4267	0.263881	31.25	31.73
70°C 30 min	3	31.27	0.506853	30.74	31.75
70°C 50 min	3	31.41	0.183303	31.21	31.57
Control	3	32.6967	0.190351	32.5	32.88
Total	12	31.45	0.302505	30.74	32.88

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.01129	4	1.00282	12.57	0.0006
Intra grupos	0.7978	10	0.07978		
Total (Corr.)	4.80909	14			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halo de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 12.5699, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halo de inhibición (mm) entre un nivel de Ensayo y otro, con un nivel del 5% de significación. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Método: 95.0 porcentaje LSD

Ensayo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
70°C 30 min	3	31.27	X
70°C 50 min	3	31.41	X
70°C 10 min	3	31.4267	X
100°C 10 min	3	31.6933	X
Control	3	32.6967	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100°C 10 min - 70°C 10 min		0.266667	0.51386
100°C 10 min - 70°C 30 min		0.423333	0.51386
100°C 10 min - 70°C 50 min		0.283333	0.51386
100°C 10 min - Control	*	-1.00333	0.51386
70°C 10 min - 70°C 30 min		0.156667	0.51386
70°C 10 min - 70°C 50 min		0.0166667	0.51386
70°C 10 min - Control	*	-1.27	0.51386
70°C 30 min - 70°C 50 min		-0.14	0.51386
70°C 30 min - Control	*	-1.42667	0.51386
70°C 50 min - Control	*	-1.28667	0.51386

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Anexo 15: D15. ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa 2TH03-BL13 por temperatura

Resumen Estadístico para Halo de inhibición (mm)

Ensayo	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
100°C 10 min	3	25.0833	0.171561	24.9	25.24
70°C 10 min	3	23.8933	0.258134	23.72	24.19
70°C 30 min	3	24.1367	0.629312	23.41	24.5
70°C 50 min	3	24.1633	0.109697	24.1	24.29
Control	3	30.1033	0.381357	29.68	30.42
Total	15	25.6027	0.70447	23.41	30.42

Tabla ANOVA para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	82.7644	4	20.6911	159.27	0.0000
Intra grupos	1.29913	10	0.129913		
Total (Corr.)	84.0636	14			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halo de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 159.269, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halo de inhibición (mm) entre un nivel de Ensayo y otro, con un nivel del 5% de significación. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Método: 95.0 porcentaje LSD

Ensayo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
70°C 10 min	3	23.8933	X
70°C 30 min	3	24.1367	X
70°C 50 min	3	24.1633	X
100°C 10 min	3	25.0833	X
Control	3	30.1033	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100°C 10 min - 70°C 10 min	*	1.19	0.655729

Continuación...

100°C 10 min - 70°C 30 min	*	0.946667	0.655729
100°C 10 min - 70°C 50 min	*	0.92	0.655729
100°C 10 min - Control	*	-5.02	0.655729
70°C 10 min - 70°C 30 min		-0.243333	0.655729
70°C 10 min - 70°C 50 min		-0.27	0.655729
70°C 10 min - Control	*	-6.21	0.655729
70°C 30 min - 70°C 50 min		-0.0266667	0.655729
70°C 30 min - Control	*	-5.96667	0.655729
70°C 50 min - Control	*	-5.94	0.655729

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 7 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Anexo 16: D6. ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa 2TH03-BL12 por proteasa

Ensayo	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
Control	3	32.6967	0.190351	32.5	32.88
Proteinasas K	3	0	0	0	0
Proteinasas de <i>Streptomyces</i>	3	0	0	0	0
Quimiotripsina	3	0	0	0	0
Tripsina	3	0	0	0	0
Total	15	6.53933	13.5379	0	32.88

Resumen Estadístico para Halo de inhibición (mm)

Tabla ANOVA para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2565.77	4	641.443	88515.62	0.0000
Intra grupos	0.0724667	10	0.00724667		
Total (Corr.)	2565.85	14			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halo de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 88515.6, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halo de inhibición (mm) entre un nivel de Ensayo y otro, con un nivel del 5% de significación. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Método: 95.0 porcentaje LSD

Ensayo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Proteinasa K	3	0	X
Proteinasa de <i>Streptomyces</i>	3	0	X
Quimiotripsina	3	0	X
Tripsina	3	0	X
Control	3	32.6967	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - Proteinasa K	*	32.6967	0.15487
Control - Proteinasa de <i>Streptomyces</i>	*	32.6967	0.15487
Control - Quimiotripsina	*	32.6967	0.15487
Control - Tripsina	*	32.6967	0.15487
Proteinasa K - Proteinasa de <i>Streptomyces</i>		0	0.15487
Proteinasa K - Quimiotripsina		0	0.15487
Proteinasa K - Tripsina		0	0.15487
Proteinasa de <i>Streptomyces</i> - Quimiotripsina		0	0.15487
Proteinasa de <i>Streptomyces</i> - Tripsina		0	0.15487
Quimiotripsina - Tripsina		0	0.15487

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Anexo 17: D17. ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa 2TH03-BL13 por proteasa

Resumen Estadístico para Halo de inhibición (mm)

Ensayo	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
Control	3	30.1033	0.381357	29.68	30.42
Proteinasas K	3	0	0	0	0
Proteinasas de <i>Streptomyces</i>	3	0	0	0	0
Quimiotripsina	3	0	0	0	0
Tripsina	3	0	0	0	0
Total	15	6.02067	12.4648	0	30.42

Tabla ANOVA para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2174.91	4	543.726	18693.32	0.0000
Intra grupos	0.290867	10	0.0290867		
Total (Corr.)	2175.2	14			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halo de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 18693.3, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halo de inhibición (mm) entre un nivel de Ensayo y otro, con un nivel del 5% de significación. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Método: 95.0 porcentaje LSD

Ensayo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Proteinasas K	3	0	X
Proteinasas de <i>Streptomyces</i>	3	0	X
Quimiotripsina	3	0	X
Tripsina	3	0	X
Control	3	30.1033	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - Proteinasas K	*	30.1033	0.310273
Control - Proteinasas de <i>Streptomyces</i>	*	30.1033	0.310273
Control - Quimiotripsina	*	30.1033	0.310273
Control - Tripsina	*	30.1033	0.310273
Proteinasas K - Proteinasas de <i>Streptomyces</i>		0	0.310273
Proteinasas K - Quimiotripsina		0	0.310273
Proteinasas K - Tripsina		0	0.310273
Proteinasas de <i>Streptomyces</i> - Quimiotripsina		0	0.310273
Proteinasas de <i>Streptomyces</i> - Tripsina		0	0.310273
Quimiotripsina - Tripsina		0	0.310273

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entrecada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Anexo 18: D18. ANOVA multifactorial - halo de inhibición de control, neutralizado y catalasa por cepa

Análisis de Varianza para Halo de inhibición (mm) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Cepa	18.1001	1	18.1001	68.59	0.0000
B:Tratamiento	1.37448	2	0.687239	2.60	0.1150
INTERACCIONES					
AB	3.51341	2	1.75671	6.66	0.0113
RESIDUOS	3.16653	12	0.263878		
TOTAL (CORREGIDO)	26.1546	17			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Halo de inhibición (mm) en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Halo de inhibición (mm) con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Halo de inhibición (mm) con intervalos de confianza del 95.0%

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
MEDIA GLOBAL	18	31.7628			
Cepa					
2TH03-BL12	9	32.7656	0.17123	32.3925	33.1386
2TH03-BL13	9	30.76	0.17123	30.3869	31.1331
Tratamiento					
Catalasa	6	31.4	0.209713	30.9431	31.8569
Control	6	32.07	0.209713	31.6131	32.5269
Neutralizado	6	31.8183	0.209713	31.3614	32.2753
Cepa por Tratamiento					
2TH03-BL12;Catalasa	3	32.6967	0.296579	32.0505	33.3429
2TH03-BL12;Control	3	33.4033	0.296579	32.7571	34.0495
2TH03-BL12;Neutralizado	3	32.1967	0.296579	31.5505	32.8429
2TH03-BL13;Catalasa	3	30.1033	0.296579	29.4571	30.7495
2TH03-BL13;Control	3	30.7367	0.296579	30.0905	31.3829
2TH03-BL13;Neutralizado	3	31.44	0.296579	30.7938	32.0862

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la media de Halo de inhibición (mm) para cada uno de los niveles de los factores. También muestra los errores estándar de cada media, los cuales son una medida de la variabilidad en su muestreo. Las

dos columnas de la extrema derecha muestran intervalos de confianza del 95.0% para cada una de las medias. Pueden desplegarse estas medias e intervalos seleccionado Gráfica de Medias de la lista de Opciones Gráficas.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición (mm) por Cepa

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2TH03-BL13	9	30.76	0.17123	X
2TH03-BL12	9	32.7656	0.17123	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2TH03-BL12 - 2TH03-BL13	*	2.00556	0.527614

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Anexo 19: D19. ANOVA multifactorial - halo de inhibición temperatura por cepa

Análisis de Varianza para Halo de inhibición (mm) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Cepa	305.093	1	305.093	2815.81	0.0000
B:Tratamiento	2.07985	3	0.693282	6.40	0.0047
INTERACCIONES					
AB	0.670046	3	0.223349	2.06	0.1458
RESIDUOS	1.7336	16	0.10835		
TOTAL (CORREGIDO)	309.576	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Halo de inhibición (mm) en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Halo de inhibición (mm) con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para Halo de inhibición (mm) con intervalos de confianza del 95.0%

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	24	27.8846			
Cepa					
2TH03-BL12	12	31.45	0.0950219	31.2486	31.6514
2TH03-BL13	12	24.3192	0.0950219	24.1177	24.5206
Tratamiento					
100°C 10 min	6	28.3883	0.134381	28.1035	28.6732
70°C 10 min	6	27.66	0.134381	27.3751	27.9449
70°C 30 min	6	27.7033	0.134381	27.4185	27.9882
70°C 50 min	6	27.7867	0.134381	27.5018	28.0715
Cepa por Tratamiento					
2TH03-BL12;100°C 10 min	3	31.6933	0.190044	31.2905	32.0962
2TH03-BL12;70°C 10 min	3	31.4267	0.190044	31.0238	31.8295
2TH03-BL12;70°C 30 min	3	31.27	0.190044	30.8671	31.6729
2TH03-BL12;70°C 50 min	3	31.41	0.190044	31.0071	31.8129
2TH03-BL13;100°C 10 min	3	25.0833	0.190044	24.6805	25.4862
2TH03-BL13;70°C 10 min	3	23.8933	0.190044	23.4905	24.2962
2TH03-BL13;70°C 30 min	3	24.1367	0.190044	23.7338	24.5395
2TH03-BL13;70°C 50 min	3	24.1633	0.190044	23.7605	24.5662

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la media de Halo de inhibición (mm) para cada uno de los niveles de los factores. También muestra los errores estándar de cada media, los cuales son una medida de la variabilidad en su muestreo. Las dos columnas de la extrema derecha muestran intervalos de confianza del 95.0% para cada una de las medias. Pueden desplegarse estas medias e intervalos seleccionado Gráfica de Medias de la lista de Opciones Gráficas.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición (mm) por Cepa

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2TH03-BL13	12	24.3192	0.0950219	X
2TH03-BL12	12	31.45	0.0950219	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2TH03-BL12 - 2TH03-BL13	*	7.13083	0.284876

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Anexo 20: D20. ANOVA simple - halo de inhibición de las cepas control (*L. lactis*, *L. plantarum* y *L. curvatus*) por ensayo

ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa *L. lactis* por ensayo

Resumen Estadístico para Halo de inhibición (mm)

Ensayo	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
Catalasa	3	27.1967	0.115902	27.12	27.33
Control	3	28.0567	0.533135	27.56	28.62
Neutralizado	3	27.8667	0.239653	27.59	28.01
Total	9	27.7067	0.491782	27.12	28.62

Tabla ANOVA para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.2246	2	0.6123	5.17	0.0495
Intra grupos	0.7102	6	0.118367		
Total (Corr.)	1.9348	8			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halo de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 5.17291, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halo de inhibición (mm) entre un nivel de Ensayo y otro, con un nivel del 5% de significación. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Método: 95.0 porcentaje LSD

Ensayo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Catalasa	3	27.1967	X
Neutralizado	3	27.8667	XX
Control	3	28.0567	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Catalasa - Control	*	-0.86	0.687367
Catalasa - Neutralizado		-0.67	0.687367
Control - Neutralizado		0.19	0.687367

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa *L. plantarum* por ensayo

Resumen Estadístico para Halo de inhibición (mm)

Ensayo	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
Catalasa	3	26.87	0.314325	26.51	27.09
Control	3	27.1167	0.257941	26.83	27.33
Neutralizado	3	27.7	0.343948	27.31	27.96
Total	9	27.2289	0.45515	26.51	27.96

Tabla ANOVA para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.09002	2	0.545011	5.76	0.0401
Intra grupos	0.567267	6	0.0945444		
Total (Corr.)	1.65729	8			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halo de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 5.7646, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halo de inhibición (mm) entre un nivel de Ensayo y otro, con un nivel del 5% de significación. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición (mm) L.p por Ensayo

Método: 95.0 porcentaje LSD

Ensayo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Catalasa	3	26.87	X
Control	3	27.1167	XX
Neutralizado	3	27.7	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Catalasa - Control		-0.246667	0.614316
Catalasa - Neutralizado	*	-0.83	0.614316
Control - Neutralizado		-0.583333	0.614316

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa *L. curvatus* por ensayo

Resumen Estadístico para Halo de inhibición (mm)

<i>Ensayo</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Catalasa	3	27.3233	0.378065	27.03	27.75
Control	3	29.8267	0.161658	29.64	29.92
Neutralizado	3	29.8	0.164621	29.7	29.99
Total	9	28.9833	1.26459	27.03	29.99

Tabla ANOVA para Halo de inhibición (mm) L.c por Ensayo

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	12.4013	2	6.20063	94.83	0.0000
Intra grupos	0.392333	6	0.0653889		
Total (Corr.)	12.7936	8			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halo de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 94.827, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halo de inhibición (mm) entre un nivel de Ensayo y otro, con un nivel del 5% de significación. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Ensayo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Catalasa	3	27.3233	x
Neutralizado	3	29.8	x
Control	3	29.8267	x

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Catalasa - Control	*	-2.50333	0.510888
Catalasa - Neutralizado	*	-2.47667	0.510888
Control - Neutralizado		0.026667	0.510888

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa *L. lactis* por temperatura

Resumen Estadístico para Halo de inhibición (mm)

Ensayo	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
100°C 10 min	3	24.8267	0.219393	24.58	25.0
70°C 10 min	3	26.4733	0.162891	26.36	26.66
70°C 30 min	3	24.96	0.157162	24.82	25.13
70°C 50 min	3	25.53	0.19	25.32	25.69
Control	3	27.1967	0.115902	27.12	27.33
Total	15	25.7973	0.951971	24.58	27.33

Tabla ANOVA para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12.3897	4	3.09742	104.01	0.0000
Intra grupos	0.2978	10	0.02978		
Total (Corr.)	12.6875	14			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halo de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 104.01, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halo de inhibición (mm) entre un nivel de Ensayo y otro, con un nivel del 5% de significación. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Método: 95.0 porcentaje LSD

Ensayo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100°C 10 min	3	24.8267	X
70°C 30 min	3	24.96	X
70°C 50 min	3	25.53	X
70°C 10 min	3	26.4733	X
Control	3	27.1967	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100°C 10 min - 70°C 10 min	*	-1.64667	0.31395
100°C 10 min - 70°C 30 min		-0.133333	0.31395
100°C 10 min - 70°C 50 min	*	-0.703333	0.31395
100°C 10 min - Control	*	-2.37	0.31395
70°C 10 min - 70°C 30 min	*	1.51333	0.31395
70°C 10 min - 70°C 50 min	*	0.943333	0.31395
70°C 10 min - Control	*	-0.723333	0.31395
70°C 30 min - 70°C 50 min	*	-0.57	0.31395
70°C 30 min - Control	*	-2.23667	0.31395
70°C 50 min - Control	*	-1.66667	0.31395

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 9 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa *L. plantarum* por temperatura

Resumen Estadístico para Halo de inhibición (mm)

Ensayo	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
100°C 10 min	3	24.65	0.0984886	24.57	24.76
70°C 10 min	3	26.2933	0.447363	25.78	26.6
70°C 30 min	3	25.5067	0.151438	25.4	25.68
70°C 50 min	3	26.38	0.307896	26.12	26.72
Control	3	26.87	0.314325	26.51	27.09
Total	15	25.94	0.843395	24.57	27.09

Tabla ANOVA para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9.10567	4	2.27642	26.70	0.0000
Intra grupos	0.852733	10	0.0852733		
Total (Corr.)	9.9584	14			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halo de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 26.6955, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halo de inhibición (mm) entre un nivel de Ensayo y otro, con un nivel del 5% de significación. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Método: 95.0 porcentaje LSD

Ensayo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100°C 10 min	3	24.65	x
70°C 30 min	3	25.5067	x
70°C 10 min	3	26.2933	x
70°C 50 min	3	26.38	xx
Control	3	26.87	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100°C 10 min - 70°C 10 min	*	-1.64333	0.531256
100°C 10 min - 70°C 30 min	*	-0.856667	0.531256
100°C 10 min - 70°C 50 min	*	-1.73	0.531256
100°C 10 min - Control	*	-2.22	0.531256
70°C 10 min - 70°C 30 min	*	0.786667	0.531256
70°C 10 min - 70°C 50 min		-0.0866667	0.531256
70°C 10 min - Control	*	-0.576667	0.531256
70°C 30 min - 70°C 50 min	*	-0.873333	0.531256
70°C 30 min - Control	*	-1.36333	0.531256
70°C 50 min - Control		-0.49	0.531256

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 8 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

ANOVA simple - halo de inhibición de la cepa *L. curvatus* por temperatura

Resumen Estadístico para Halo de inhibición (mm)

Ensayo	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
100°C 10 min	3	26.4167	0.341516	26.12	26.79
70°C 10 min	3	27.0667	0.0503322	27.02	27.12
70°C 30 min	3	25.45	0.527162	24.87	25.9
70°C 50 min	3	26.6433	0.292632	26.32	26.89
Control	3	27.3233	0.378065	27.03	27.75
Total	15	26.58	0.733981	24.87	27.75

Tabla ANOVA para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6.29093	4	1.57273	12.57	0.0006
Intra grupos	1.25127	10	0.125127		
Total (Corr.)	7.5422	14			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halo de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 12.5691, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halo de inhibición (mm) entre un nivel de Ensayo y otro, con un nivel del 5% de significación. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halo de inhibición (mm) por Ensayo

Método: 95.0 porcentaje LSD

Ensayo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
70°C 30 min	3	25.45	X
100°C 10 min	3	26.4167	X
70°C 50 min	3	26.6433	XX
70°C 10 min	3	27.0667	XX
Control	3	27.3233	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100°C 10 min - 70°C 10 min	*	-0.65	0.643536
100°C 10 min - 70°C 30 min	*	0.966667	0.643536
100°C 10 min - 70°C 50 min		-0.226667	0.643536
100°C 10 min - Control	*	-0.906667	0.643536
70°C 10 min - 70°C 30 min	*	1.61667	0.643536
70°C 10 min - 70°C 50 min		0.423333	0.643536
70°C 10 min - Control		-0.256667	0.643536
70°C 30 min - 70°C 50 min	*	-1.19333	0.643536
70°C 30 min - Control	*	-1.87333	0.643536
70°C 50 min - Control	*	-0.68	0.643536

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 7 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.