

Identificación de bacterias acidolácticas antagonicas de *Salmonella enterica* var. Typhimurium aisladas de queso artesanal*

Identification of antagonistic acidolactic bacteria of *Salmonella enterica* var. Typhimurium isolated from artisanal cheese

Jovany Fortino Rivera de la Cruz¹, Abraham Villegas de Gante¹, Luis Alberto Miranda Romero^{2§}, José Luis García Cué³

¹Unidad Académica de Ingeniería Agroindustrial-Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco, km 38.5. Chapingo, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. Tel. (595) 9521500. (jovany.fortino@gmail.com; abecamus@gmail.com). ²Unidad Académica de Zootecnia-Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco, km 38.5. Chapingo, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. Tel. (595) 9521500. ³Estadística-Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. Tel. (595) 9520200, ext. 1414. (jlgcué@colpos.mx). [§]Autor para correspondencia: microbiologia.pecuaria08@gmail.com.

Resumen

Para la inocuidad en productos lácteos, algunas normas mexicanas hacen obligatorias diversas operaciones, una de ellas es la pasteurización; sin embargo, muchos de los quesos genuinos no podrían elaborarse realizado esta operación, ya que en bastantes casos sus características de tipicidad y genuinidad son generadas por los microorganismos nativos provenientes de la llamada leche cruda; por lo anterior, la razón de esta investigación fue la aportación de pruebas de que la fermentación acidoláctica podría ser una alternativa a la pasteurización. Para lograrlo, se propuso el objetivo de identificar en género y especie algunas bacterias acidolácticas nativas de un queso artesanal genuino mexicano que tuvieran capacidad antagonica en contra de *Salmonella enterica* var. Typhimurium y estudiar sus características tecnológicas. Para lograrlo, se aislaron cepas de BAL en MRSA de un queso artesanal genuino, se realizaron pruebas de antagonismo en TSA en busca de aquellas con algún efecto inhibitorio en contra de salmonella. Posteriormente, se identificaron el género y la especie de las que mayor efecto tuvieron y se estudiaron sus características tecnológicas. La investigación se hizo en el laboratorio de microbiología pecuaria de la UA-Zootecnia,

Abstract

For the safety in dairy products, some Mexican regulations make different operations compulsory, one of them is pasteurization; however, many of the genuine cheeses could not be made under this operation, since in many cases their characteristics of typicality and genuineness are generated by the native microorganisms coming from the so-called raw milk; therefore, the reason for this research was the contribution of evidence that acidolactic fermentation could be an alternative to pasteurization. In order to achieve this, the objective was to identify in genus and species some acidolactic bacteria native to a genuine Mexican artisanal cheese that had an antagonistic capacity against *Salmonella enterica* var. Typhimurium and to study its technological characteristics. To achieve this, strains of BAL in MRSA were isolated from a genuine artisanal cheese, antagonism tests were performed on TSA searching for those with some inhibitory effect against salmonella. Subsequently, the genus and the species with the greatest effect were identified and their technological characteristics were studied. The research was performed in the UA-Zootecnia livestock microbiology laboratory, UACH, from March-June 2015. 11 strains of BAL with

* Recibido: enero de 2017
Aceptado: marzo de 2017

UACH de marzo-junio de 2015. Se encontraron 11 cepas de (BAL) con actividad antagónica y se identificaron las especies *Lactococcus lactis* subespecie cremoris y *Leuconostoc* spp. como las que mayor efecto de inhibición tuvieron. Al tener BAL en el queso artesanal con actividad antagónica en contra de un patógeno como salmonella se aportaron pruebas de que la fermentación acidoláctica es una alternativa a la pasteurización.

Palabras clave: *Lactococcus lactis* subespecie cremoris, *Salmonella enterica* var. Typhimurium, *Leuconostoc* spp., quesos artesanales.

Introducción

La inocuidad de cualquier alimento es una característica indispensable que debe tener todo producto al consumirlo, por eso se han diseñado normas para que esto se lleve a cabo, en cumplimiento de un marco normativo obligatorio. Sin embargo, las normas establecidas en algunas ocasiones se han elaborado sin tener en cuenta completamente las características de las actividades productivas reales (Arispe y Tapia, 2007).

Para el caso específico de los quesos genuinos mexicanos, por ejemplo, la norma NOM-243-SSA1-2010 (Secretaría de Salud, 2010), hace obligatorias diversas operaciones que muchas veces en los procesos para la elaboración de los quesos de este tipo, no se llevan a cabo; esto los pone en una situación de incumplimiento con las normas y genera diversas complicaciones a los productores. La utilización de leche pasteurizada por atender la inocuidad, es una de las principales operaciones que la norma marca, sin embargo muchos de los quesos genuinos no podrían elaborarse realizado este proceso, ya que muchas de las características que los identifican y los hacen genuinos son generadas por los microorganismos nativos provenientes de la leche sin pasteurizar. El no pasteurizar no deriva necesariamente en una falta de inocuidad, pero es una manera fácil y práctica que las autoridades en salud utilizan para forzar a las pequeñas queserías, generalmente artesanales a cumplir con la normatividad.

Esta discriminación hacia la forma de producción afecta directamente la competitividad del sector quesero artesanal, alentando la depreciación, no solamente económica, sino también social de sus productos y obliga a que los productores

antagonistic activity were identified and the species *Lactococcus lactis* subspecies cremoris and *Leuconostoc* spp. were identified as the ones that had greater inhibition effect. Having BAL in artisanal cheese with antogonic activity against a pathogen such as salmonella provided evidence that acidolactic fermentation is an alternative to pasteurization.

Keywords: *Lactococcus lactis* subspecies cremoris, *Leuconostoc* spp., *Salmonella enterica* var. Typhimurium, artisanal cheeses.

Introduction

The safety of any food is an essential characteristic that every product should have when consuming it, that is why standards have been designed for this to be carried out, in compliance with a mandatory regulatory framework. However, the rules established on some occasions have been elaborated without taking into account the characteristics of real productive activities (Arispe and Tapia, 2007).

In the specific case of genuine Mexican cheeses, for example, the standard NOM-243-SSA1-2010 (Ministry of Health, 2010), makes obligatory several operations that are not carried out many times in the elaboration processes of cheeses of this type; this places them in a situation of non-compliance with the rules and generates various complications to the producers. The use of pasteurized milk to attend safety is one of the main operations that the standard marks, however many of the genuine cheeses could not be elaborated under this process, since many of the characteristics that identify them and make them genuine are generated by native microorganisms from unpasteurized milk. Non-pasteurizing does not necessarily result in a lack of safety, but it is an easy and practical way that health authorities use to force small dairies, usually artisanals to comply with regulations.

This discrimination towards this production way, directly affects the competitiveness of the artisanal cheese-making sector by encouraging not only the economic but also the social depreciation of its products and obliges producers to abandon these production systems or to replace them with others that are more profitable, thus generating the loss of genuine processes and products.

a abandonar estos sistemas de producción, o sustituirlos por otros, que les sean más redituables, generándose así la pérdida de los procesos y productos genuinos.

El hecho de que en México exista una reglamentación que, enfocada hacia a la inocuidad, genera la pérdida de diversos procesos artesanales y no permite otra alternativa que pudiese contribuir a que éstos se mantengan, es razón para realizar dicha investigación, ayudando de esta manera no sólo a la preservación de dichos procesos. Esto puede ayudar a la preservación de los alimentos artesanales que son parte importante no sólo de nuestra cultura culinaria sino también parte de los rasgos que nos identifican como nación; concretamente este trabajo puede contribuir a resolver la situación reglamentaria que afecta a los productores de quesos genuinos artesanales mexicanos (Cervantes *et al.*, 2008).

En el país, la Secretaría de Salud, a través de la norma oficial antes mencionada, considera que en los productos lácteos, como los quesos, debe haber un límite de microorganismos indicadores y también que no debe haber patógenos, por lo que hace obligatoria la pasteurización (NOM, 2010). Sin embargo esta postura oficial debería ser reevaluada a la luz de una mayor comprensión de las características de los quesos artesanales existentes, en cuyas pastas se llevan a cabo fermentaciones complejas que contribuyen a su inocuidad.

De acuerdo con Jay *et al.* (2006), los agentes patógenos más importantes en los productos lácteos son: *Streptococcus mastitidis*, causante de la mastitis contagiosa, *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus* y *Salmonella* spp.

En particular la *Salmonella* spp., es un patógeno importante que se ha encontrado en quesos frescos de leche cruda y pasteurizados, llega a éstos por diversos medios y constituye un problema serio en la calidad de este producto. En ese sentido a través de la reglamentación oficial se ha insistido en que la problemática en la producción artesanal atañe a los procesos de elaboración queso, sin enfocar el sistema completo de producción y las diferentes vertientes que puede haber en la producción y que pueden llevar a la falta de inocuidad en el producto como malas prácticas agropecuarias, malas prácticas de manufactura, malas prácticas en la distribución del producto e incluso en la venta, así en como otras operaciones existentes en la cadena de distribución que pueden generar contaminación de los quesos artesanales (Scaramelli *et al.*, 1999).

The fact that in México there is a regulation that, focused on safety, generates the loss of various artisan processes and does not allow another alternative that could contribute to their maintenance, is reason to carry out this research, thus helping not only to the preservation of such processes. This might help the preservation of artisanal foods that are an important part not only of our culinary culture but also part of the traits that identify us as a nation; specifically this paper might contribute to solve the regulatory situation that affects producers of genuine Mexican artisanal cheeses (Cervantes *et al.*, 2008).

In the country, the Ministry of Health, through the official standard mentioned above, considers that in dairy products, such as cheeses, there should be a limit of indicator microorganisms and also that there should not be any pathogens, making pasteurisation mandatory (NOM, 2010). However, this official position should be re-evaluated in the light of a better understanding of the characteristics of artisanal cheeses, in which pulps are carried out complex fermentations that contribute to its innocuousness.

According to Jay *et al.* (2006), the most important pathogens in dairy products are: *Streptococcus mastitidis*, which causes contagious mastitis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus* and *Salmonella* spp.

In particular *Salmonella* spp., is an important pathogen that has been found in fresh cheeses of raw and pasteurized milk, getting there through several ways and it constitutes a serious problem in the quality of this product. In this sense, through official regulations, it has been emphasized that the problem in artisanal production concerns the processes of cheese processing, without focusing on the complete production system and the different aspects that may exist in production and that can lead to lack of safety in the product such as bad agricultural practices, poor manufacturing practices, bad practices in product distribution and even sales, as well as other existing operations in the distribution chain that can generate contamination of artisanal cheeses (Scaramelli *et al.*, 1999).

The World Health Organization (OMS, 2008) and Longo (2013) agree that salmonellosis, as well as most gastrointestinal diseases, is one of the main conditions for which people require medical care, not only in México but all over the world. For example, for the specific case of typhoid, there is a worldwide tendency to rise almost exponentially from 2002, with 22 million cases, with a stabilization in 2007; however, it continues to rise.

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2008) y Longo (2013) coinciden en que la salmonelosis, así como la mayoría de las enfermedades gastrointestinales, es una de las principales afecciones por las que las personas requieren atención médica, no sólo en México sino en todo el mundo. Por ejemplo, para el caso específico de la tifoidea, existe una tendencia mundial al alza casi exponencial a partir del año 2002, con 22 millones de casos, teniendo una estabilización en 2007; sin embargo, ésta sigue al alza.

En los países desarrollados, la incidencia de casos ha disminuido por las mejoras sanitarias, sin embargo se estima que cada año ocurren en el mundo aproximadamente 17 millones de casos con 300 000 fallecidos (INS, 2014).

La enfermedad es causada por *Salmonella typhimurium* y en otras ocasiones menos frecuentes, por algunas de las variedades de *Salmonella paratyphi*, que atacan específicamente al hombre. El microorganismo tiene vía de transmisión oral-fecal, por lo que puede encontrarse en alimentos manejados por portadores, que han tenido contacto con agua de drenaje, como vegetales irrigados con ella, algunos alimentos provenientes del mar, entre otros (Díaz, 2005). Uno de estos alimentos son los quesos artesanales.

Por lo anterior existe la necesidad de buscar una alternativa a la pasteurización de la leche con que se elaboran los quesos, una de ellas podría ser la fermentación acidoláctica generada por las bacterias acidolácticas (BAL) presentes en la microflora nativa de la leche y que realizan procesos de fermentación en los quesos. El hecho de comprobar que la fermentación, generada por las bacterias acidolácticas (BAL), puede inhibir a un patógeno como salmonella, aporta pruebas y el problema puede ser de otra índole. Como parte de la investigación en el presente trabajo se muestran parte de los resultados obtenidos.

Por fortuna, en variadas investigaciones se ha comprobado que cepas nativas de bacterias acidolácticas (BAL), aisladas de quesos artesanales mexicanos y de otros países, han tenido efectos inhibitorios contra diversos patógenos incluida la *Salmonella* spp. (Del Campo *et al.*, 2008).

En este trabajo se intenta demostrar que la fermentación láctica desarrollada por dichas BAL es capaz de inhibir el crecimiento de este patógeno, así los resultados de esta investigación podrían contribuir a demostrar que la inocuidad en quesos artesanales de leche cruda podría lograrse por esta vía biológica, sin recurrir a la pasteurización.

In developed countries, the incidence of cases has been reduced by sanitary improvements, however, it is estimated that approximately 17 million cases per year occur in the world with 300 000 deaths (INS, 2014).

The disease is caused by *Salmonella typhimurium* and in other less frequent occasions, by some of the varieties of *Salmonella paratyphi*, that specifically attack humans. The microorganism has an oral-faecal transmission route, so it can be found in foods handled by carriers, which have had contact with drainage water, such as vegetables irrigated with it, some foods from the sea, among others (Díaz, 2005). One of these foods are artisanal cheeses.

Due to the above, there is a need to find an alternative to milk's pasteurization with which cheeses are made, one of them could be the acidolactic fermentation generated by acidolactic bacteria (BAL) present in the native milk microflora that perform fermentation processes in cheeses. The fact that fermentation, generated by acidolactic bacteria (BAL), can inhibit a pathogen like salmonella, provides evidence that the problem may be of a different nature. As part of an investigation that addresses this problem, the present paper shows some of the results obtained in this research.

Fortunately, a variety of investigations have shown that native strains of acidolactic bacteria (BAL), isolated from Mexican and other artisanal cheeses, have had inhibitory effects against various pathogens including *Salmonella* spp. (Del Campo *et al.*, 2008).

This paper aims to demonstrate that the lactic fermentation developed by these BAL is able to inhibit the growth of this pathogen, so the results of this research could contribute to demonstrate that the innocuity in artisanal cheeses of raw milk could be achieved by this biological pathway, without resorting pasteurization.

Acidolactic bacteria (BAL) are a very heterogeneous group of microorganisms from a taxonomic point of view. They are bacilli or cocci Gram(+) anaerobic or facultative aerobic bacilli that respond negatively to catalase and oxidase tests. In common all BALs produce lactic acid as the principal or only metabolite in sugars fermentation. They are classified into two groups, the homofermentative ones that only produce lactic acid from glucose and the heterofermentative ones that produce CO₂ in addition to other metabolites (Parra, 2010).

Las bacterias acidolácticas (BAL) son un grupo muy heterogeneo de microorganismos desde un punto de vista taxonómico. Son bacilos o cocos Gram(+) anaerobias o aerobias facultativas y que responden negativamente a las pruebas de catalasa y oxidasa. En común todas las BAL producen ácido láctico como principal o único metabolito en la fermentación de azúcares. Están clasificadas en dos grupos, las homofermentativas que sólo producen ácido láctico a partir de la glucosa y las heterofermentativas que producen CO₂ además de otros metabolitos (Parra, 2010).

La fermentación llevada a cabo por BAL es una de las técnicas utilizadas en la industria para preservar y mejorar las propiedades sensoriales de los alimentos; este bioproceso genera metabolitos que le proporciona a los productos aromas y sabores deseados. Las principales funciones de la fermentación son la acidificación, la mejora de la textura y el desarrollo del flavor, entre otras. Las bacterias acidolácticas se encuentran presentes en la leche de manera natural, además se ha encontrado que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, a través de diferentes compuestos generados en la fermentación, siendo el ácido láctico el principal y las bacteriocinas el más efectivo (Piña *et al.*, 2011).

Mataragas (2003); Peláez (2005); Palomino (2012); Parra (2010), explican que las bacterias acidolácticas, que no sólo son responsables de brindar propiedades sensoriales deseables a los productos lácteos, sino que los subproductos de la fermentación que realizan, por ejemplo el ácido láctico y acético, el peróxido de hidrógeno, además de otros, afectan el desarrollo de variados patógenos, incluso inhibiéndolos, dándole cierta inocuidad al producto no sólo en los productos lácteos; lo anterior se ha demostrado en cada una de sus investigaciones.

En la actualidad se utilizan tanto los cultivos puros agregados a los alimentos, como los subproductos de la fermentación de las bacterias ácido-lácticas, para la conservación de los alimentos de manera comercial (Vásquez, 2009).

Las sustancias con efecto antimicrobiano con mayor efecto producidas por las BAL y que se han encontrado, para este fin son las "bacteriocinas", éstas son compuestos peptídicos naturales, que tienen efecto preferentemente en contra de bacterias Gram(+), aunque también afectan a las Gram(-). Por ejemplo la nisina, una bacteriosina producida por *Lactococcus lactis*, está aprobada y considerada segura por

The fermentation carried out by BAL is one of the techniques used in the industry to preserve and improve the sensory properties of foods; this bioprocess generates metabolites that gives the products their desired flavors and aromas. The main functions of fermentation are the acidification, the texture improvement and flavor development, among others. Acidolactic bacteria are naturally present in milk, and have been found to have the ability to inhibit the growth of pathogens such as *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, through different compounds generated in fermentation, with lactic acid being the main agent and bacteriocins being the most effective (Piña *et al.*, 2011).

Mataragas (2003); Peláez (2005); Palomino (2012); Parra (2010), explain that acidic bacteria, which are not only responsible for providing desirable sensory properties to dairy products, but the fermentation byproducts that they perform, for example lactic and acetic acid, hydrogen peroxide, in addition to others, affect the development of various pathogens, even inhibiting them, giving some harmlessness to the product not only in dairy products; this has been demonstrated in each of those investigations.

At present, both the pure cultures added to food and the byproducts of acid-lactic bacteria fermentation are used for commercial food preservation (Vásquez, 2009).

The most effective antimicrobial substances produced by BALs are the "bacteriocins", which are natural peptidic compounds, which have an effect against Gram(+) bacteria, but also affect the Gram(-). For example, nisin, a bacteriosin produced by *Lactococcus lactis*, is approved and considered safe by the FDA as an additive for food preservation and is already used commercially (Piña *et al.*, 2011). There are also antimicrobial products of a non-peptidic nature such as organic acids, diacetyl, acetoin, hydrogen peroxide, reuterine, reuterocycline, antifungal peptides and bacteriosins. Some lactic acid bacteria that have been found to secrete bacteriocins belong to the genera *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus* and *Pediococcus*. There have already been made preparations of pure and semipure bacteriocins for the inhibition of pathogens in food (Saidi, 2011).

The investigations made show that native BALs of genuine cheeses have this pathogen inhibiting effect, so that *Salmonella* spp., can also be inhibited by the action of BALs (Del Campo, 2008). The same result has also been found in several tests

la FDA, como aditivo para la conservación de alimentos y ya se usa comercialmente (Piña *et al.*, 2011). También existen productos antimicrobianos de naturaleza no peptídica como lo son los ácidos orgánicos, diacetilo, acetoina, peróxido de hidrógeno, reuterina, reuterociclina, péptidos antifúngicos y bacteriosinas. Algunas bacterias ácido lácticas que se ha encontrado secretan bacteriocinas son pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus* y *Pediococcus*. Incluso ya se han elaborado preparaciones de bacteriocinas puras y semipuras para la inhibición de patógenos en alimentos (Saidi, 2011).

La investigaciones hechas muestran que las BAL nativas de quesos genuinos tienen este efecto inhibitorio de patógenos, por lo que la *Salmonella* spp., también puede ser inhibida por la acción de las BAL (Del Campo, 2008). También se ha encontrado el mismo resultado en diversas pruebas de antagonismo de cepas de BAL con otros patógenos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* como han reportado Larios (2007); Aguilar y Klotz (2008).

Por todo lo anterior es que surge la siguiente pregunta de investigación: ¿en un queso panela artesanal que se elabora en el estado de Jalisco, México se pueden distinguir BAL con efecto antagónico en contra de *Salmonella enterica* var. Typhimurium? Para dar la respuesta a la pregunta se propuso una investigación que tuvo por objetivo identificar en género y especie algunas bacterias acidolácticas nativas de un queso genuino mexicano que tuvieran capacidad antagónica en contra de *Salmonella enterica* var. Typhimurium. y estudiar sus características tecnológicas. La hipótesis por probar fue que en un queso genuino mexicano de leche sin pasteurizar se identifican especies de BAL con efecto antagónico contra la *Salmonella enterica* var. Typhimurium.

Materiales y métodos

Para el aislamiento se tomaron dos muestras de 25 g de queso panela artesanal genuino mexicano al azar de una quesería, ubicada en Soyatlán del Oro, Jalisco, obtenidas posterior a su elaboración, transportadas a temperatura de refrigeración (menor a 8 °C) y en cubiertas plásticas y que se sacaron de refrigeración, la primera a una hora y la segunda a 24 h, fueron diluidas en 225 mL de agua destilada peptonada (0.001%, peptona de caseína) estéril y homogenizados por un minuto. Se transfirieron 10 mL de ésta dilución a un vial de 100 mL de capacidad que contenía 90 mL de agua peptonada

of antagonism of BAL strains with other pathogens such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as reported by Larios (2007) and Aguilar and Klotz (2008).

For all of the above, the following research question arises: in an artisanal panela cheese produced in the state of Jalisco, México can be distinguished BAL with an antagonistic effect against *Salmonella enterica* var. Typhimurium? In order to answer the question, an investigation was proposed that aimed to identify the genus and species of some acidolactic bacteria native to a genuine Mexican cheese that had an antagonistic capacity against *Salmonella enterica* var. Typhimurium and to study its technological characteristics. The hypothesis was that in a genuine Mexican cheese of unpasteurised milk there are BAL species with antagonistic effect against *Salmonella enterica* var. Typhimurium.

Materials and methods

For the isolation, two samples of 25 g of genuine Mexican handmade panela cheese from a dairy, located in Soyatlan del Oro, Jalisco, obtained after its elaboration, were transported at refrigeration temperature (below 8 °C) in plastic covers and removed from refrigeration, the first at one hour and the second at 24 h, then they were diluted in 225 mL of peptone distilled water (0.001%, casein peptone) sterile and homogenized for one minute. 10 mL of this dilution was transferred to a 100 mL capacity vial containing 90 mL of sterile peptone water. This same process was repeated until a 10⁻⁶ dilution was obtained. One milliliter of the 10⁻⁴, 10⁻⁵ and 10⁻⁶ dilutions were seeded in triplicate and placed in Petri dishes with ManRogosa and Sharpe (MRSA) agar medium.

Seed boxes were incubated in anaerobic jars at 37±1 °C for three days. Subsequently the colonial diversity and the population of BAL (UFC g⁻¹ of fresh cheese) were quantified. A strain of each type of colony was isolated with bacteriological handle and re-seeded on MRS agar and incubated at 37 ±1 °C for three days. Purity was confirmed by colonial and microscopic morphology by Gram staining. Gram(+) and catalase(-) strains were selected, as presumably BAL. These strains were conserved by re-planting on lean MRSA medium.

The selected BAL strains were reactivated in MRS broth at 37 °C for three days in anaerobiosis. At the end of the incubation they were centrifuged at 10 000 rpm for 10 min and the supernatant from each strain was recovered.

estéril. Éste mismo proceso se repitió hasta obtener una dilución 10^{-6} . Un mililitro de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , fue sembrado por triplicado y mediante vaciado en placa en cajas Petri con medio agar ManRogosa y Sharpe (MRSA).

Las cajas sembradas se incubaron en jarras anaeróbicas a 37 ± 1 °C, por tres días. Posteriormente se cuantificó la diversidad colonial y la población de BAL (UFC g^{-1} de queso fresco). Una cepa de cada tipo de colonia fue aislada con asa bacteriológica y resembrada en agar MRS e incubado a 37 ± 1 °C por tres días. Se confirmó la pureza mediante la morfología colonial y microscópica por tinción de Gram. Se seleccionaron las cepas Gram(+) y catalasa(-), como presuntivamente BAL. Estas cepas fueron conservadas por resiembras en medio inclinado MRSA.

Las cepas de BAL seleccionadas se reactivaron en caldo MRS a 37 °C por tres días en anaerobiosis. Al término de la incubación se centrifugaron 10 000 rpm por 10 min y el sobrenadante de cada cepa se recuperó. Posterior a esto, discos de 5 mm de diámetro fueron impregnados con 20 μ L de sobrenadante en 3 repeticiones por sobrenadante, los cuales fueron colocados en la superficie de tripteina soya agar (TSA), previamente sembrado masivamente con un cultivo en medio líquido de *Salmonella enterica* var. Typhimurium de $1 \cdot 10^8$ UFC mL^{-1} . Las cajas se incubaron a 42 °C en aerobiosis por 48h, después de las cuales se identificaron los sobrenadante de las BAL que formaron halo de inhibición de la cepa de salmonela y se midió el diámetro del halo.

Las cepas seleccionadas se identificaron mediante pruebas bioquímicas del sistema “API step 20” (bioMérieux) y el catálogo de perfiles bioquímicos proporcionado por el sistema.

Después, se estudió la cinética de crecimiento donde el cultivo reactivado de cada cepa seleccionada fue sembrado, por triplicado, en 25 mL caldo MRS estéril. Los medios se incubaron en anaerobiosis, a 37 °C, más adelante, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm cada 30 min. La absorbancia a cada tiempo de medición fue usada para determinar la tasa de crecimiento (S; segundos), el final de la fase lag o de adaptación (L; en segundos) y crecimiento máximo (DOM; absorbancia) del modelo $DO_0 = [(DOM) \cdot (1 + \text{Exp}^{(2-4 \cdot S \cdot (T-L))^{-1}})]$, para cada cepa seleccionada. A los datos obtenidos de cada uno de los parámetros se les hicieron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas para posteriormente hacerles un análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de

Subsequently, 5 mm diameter disks were impregnated with 20 μ l of supernatant in three replicates per supernatant, which were placed on the surface of trypsin soy agar (TSA), previously seeded massively with a liquid medium culture of *Salmonella enterica* var. Typhimurium of $1 \cdot 10^8$ UFC mL^{-1} . The boxes were incubated at 42 °C in aerobiosis for 48 h, after which the supernatants of the BALs that formed inhibition halo of the salmonella strain were identified and the diameter of the halo was measured.

The selected strains were identified by biochemical tests of the “API step 20” system (bioMérieux) and the catalog of biochemical profiles provided by the system.

Growth kinetics were then studied where the reactivated culture of each selected strain was seeded, in triplicate, in 25 mL sterile MRS broth. The media were incubated in anaerobiosis at 37 °C, the absorbance was measured in a spectrophotometer at 540 nm every 30 min. The absorbance at each measurement time was used to determine the growth rate (S; seconds), the end of the lag or adaptation phase (L; in seconds) and maximum growth (DOM; absorbance) of the $DO_0 = [(DOM) \cdot (1 + \text{Exp}^{(2-4 \cdot S \cdot (T-L))^{-1}})]$ model, for each selected strain. The data obtained from each of the parameters were tested for normality and homogeneity of variances to later apply variance analysis (ANOVA) with a significance level of ($\alpha = 0.05$) and Tukey mean comparison tests ($\alpha = 0.05$) to find which strain had the best developmental characteristics. The analyzes were supported by the SAS V9.4 package.

Results and discussion

Genuine cheese used in this experiment, with one hour of thawing, had a lower BAL population ($1 \cdot 10^6$ UFC g^{-1}) than the 24h thaw at room temperature ($9.7 \cdot 10^6$ UFC g^{-1}). This coincides with Del Campo *et al.* (2008), who found a concentration between 6 and 8 log cycles of UFC g^{-1} of panela cheese, whereas Ruth *et al.* (2003) quantified an average population equivalent to five log cycles in fresh cheeses, obtaining a slightly lower concentration.

During the isolation and selection procedure, 55 presumptively BAL strains were obtained. In the subsequent transfers (six) for purification, 24 (43.6%) were removed that did not meet the morphological characteristics and that were positive to the catalase test. The remaining isolates 31 (56.4%) were considered as BAL and were used for the

significancia ($\alpha= 0.05$) y pruebas de comparación de medias de Tukey ($\alpha= 0.05$) para encontrar que cepa tenía las mejores características de desarrollo. Los análisis se apoyaron del paquete SAS V9.4.

Resultados y discusión

El queso genuino usado en este experimento, con una hora de descongelación tuvo una población de BAL menor (1×10^6 UFC g^{-1}) que el de 24 h de descongelación a temperatura ambiente (9.7×10^6 UFC g^{-1}). Lo anterior coincide con Del Campo *et al.* (2008), que encontraron una concentración entre 6 y 8 ciclos logarítmicos de UFC g^{-1} de queso panela, mientras que Ruth *et al.* (2003) cuantificaron una población promedio equivalente a cinco ciclos logarítmicos en quesos frescos, obteniendo una concentración un poco más baja.

Durante el procedimiento de aislamiento y selección, se lograron obtener 55 cepas presuntamente del tipo BAL. En los trasposos posteriores (seis) para su purificación, se eliminaron 24 (43.6%) que no reunieron las características morfológicas y que dieron positivo a la prueba de catalasa. El resto de aislamientos 31 (56.4%) fueron consideradas como BAL y se usaron para la prueba de antagonismo. Once de los 31 sobrenadantes (35.5%) formaron halos de inhibición contra *Salmonella enterica* var. Typhimurium. Esta inhibición fue atribuida a la presencia de algún metabolito de las BAL (Figura 1).

Sin embargo, el efecto de ocho de los once sobrenadantes fue bajo (Figura 1) y en sólo tres el efecto fue destacable. Esto último indica que 9.6% de las BAL que colonizan provenientes de la leche con la que fue elaborado el queso genuino artesanal tipo panela, tienen efecto inhibitorio considerable en contra del crecimiento de *Salmonella enterica* var. Typhimurium. Ramírez (2008) encontró que 26% de las cepas que asilaron mostraron algún efecto inhibitorio contra de diversos patógenos Gram(+) o Gram(-), mayor al obtenido en esta investigación (20%) si consideramos los 55 aislamientos (11/55), pero menor si solo consideramos a los aislamientos presuntivos BAL (35.5%; 11/31).

Parras (2010) considera que el efecto inhibitorio bajo pudo deberse a una concentración baja de los productos de la fermentación (entre ellos el ácido láctico) de las BAL puesto que por ejemplo, la cantidad de ácido láctico producido depende de la especie e incluso de la cepa.

antagonism test. Eleven of the 31 supernatants (35.5%) formed inhibition halos against *Salmonella enterica* var. Typhimurium. This inhibition was attributed to the presence of some BAL metabolite (Figure 1).

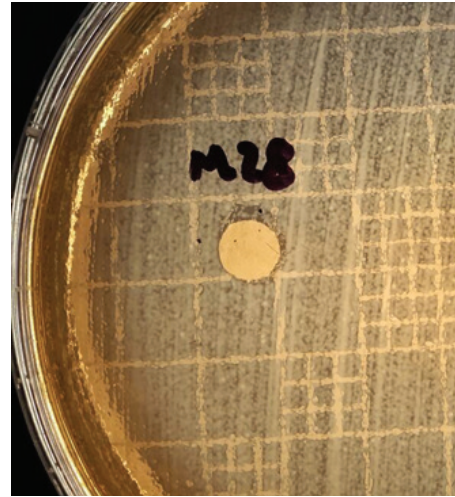


Figura 1. Halo de inhibición bajo de *Salmonella enterica* var. Typhimurium generado por el efecto de los metabolitos de una cepa de BAL aislada de queso artesanal.

Figure 1. Low inhibition halo of *Salmonella enterica* var. Typhimurium generated by the metabolite effect of a BAL strain isolated from artisanal cheese.

However, the effect of eight of the eleven supernatants was low (Figure 1) and it was remarkable only in three. The latter indicates that 9.6% of the BAL that colonize from the milk with which the genuine artisanal panela cheese was made has a considerable inhibitory effect against the growth of *Salmonella enterica* var. Typhimurium. Ramírez (2008) found that 26% of the asylum strains showed an inhibitory effect against various Gram(+) or Gram(-) pathogens, which is higher than that obtained in this research (20%), considering 55 isolates (11/55), but lower if we only consider the presumed BALs (35.5%, 11/31).

Parras (2010) considers that the low inhibitory effect could be due to a low concentration of the fermentation products (among them lactic acid) of the BAL since for example the amount of lactic acid produced depends on the species and even on the strain.

The pH in the supernatants was measured giving a value of 4.9. The above agrees with that published by Makras *et al.* (2005) who demonstrated that the main cause of

Se midió el pH en los sobrenadantes dando un valor de 4.9. Lo anterior concuerda con lo publicado por Makras *et al.* (2005) que demostraron que la principal causa de la inhibición de *Salmonella enterica* var. Typhimurium por cepas de BAL en un medio sintético, es la caída del pH a valores entre 5 y 4.5. Por su parte Aguilar *et al.* (2008) percibieron que la disminución del pH a un valor inferior a 5 está relacionado al efecto de inhibición de las BAL contra *Salmonella* sp, cuya población disminuyó en tres ciclos logarítmicos. Piña *et al.* (2011) menciona la posibilidad de que existan otros metabolitos con la misma función.

Una vez realizadas las pruebas del sistema “API step 20” (bioMérieux) se obtuvieron los perfiles bioquímicos de las tres cepas estudiadas, luego de esto se buscó y comparó con los perfiles presentados en el catálogo, proporcionados por el mismo sistema, para conocer que género y especie era cada microorganismo. En la Cuadro 1 se presentan los perfiles bioquímicos de las cepas comparándolos con los perfiles bioquímicos de las especies a las que corresponden, en donde se representa con el símbolo “+” si metabolizaron la sustancia correspondiente y con el símbolo “-” en caso de no hacerlo, generando así los perfiles de cada cepa.

De acuerdo con las reacciones bioquímicas del sistema “API step 20” (bioMérieux), la cepa “1” se identificó como *Leuconostoc* spp. El sistema “API 20 step” no identifica las especies del género *Leuconostoc*; sin embargo, García *et al.* (2004) muestra que las especies del género que metabolizan la lactosa y que se encuentran en los productos lácteos y en leche cruda son *L. mesenteroides*, *L. lactis* y *L. argentinum*; por ende la cepa debe pertenecer a alguna de estas tres especies.

Las cepas “2” y “3” se ajustaron a perfil de *Lactococcus lactis* subespecie cremoris. Koneman (2006); Alais (1985) explican que esta especie mesófila, homofermentativa es la más ampliamente utilizada en productos lácteos, principalmente en quesos. Asimismo Del Castillo *et al.* (2004) exponen que *Lactococcus lactis* subespecie cremoris es una especie deseable dado que aporta propiedades organolépticas al producto; además de brindarle un presuntivo efecto de protector contra patógenos.

Rodríguez (2007), encontró que 22% de las cepas BAL aisladas a partir de leche y de quesos artesanales y semindustriales, son del género *Leuconostoc*, la mayoría fue encontrada en quesos no madurados o con 10 días de máxima maduración y con pH entre 4.6 y 6.3, condiciones similares al queso utilizado para el aislamiento de BAL en este estudio.

Salmonella enterica var. Typhimurium by BAL strains in a synthetic medium, is the drop in pH to values between 5 and 4.5. On the other hand Aguilar *et al.* (2008) perceived that a pH decrease to a value lower than 5 is related to the inhibition effect of BAL against *Salmonella* sp., whose population decreased in three log cycles. Piña *et al.* (2011) mentions the possibility of other metabolites with the same function.

After the tests of the “API step 20” system (bioMérieux) the biochemical profiles of the three strains studied were obtained, after which it was searched and compared with the profiles presented in the catalog, provided by the same system, to know the Genus and species of each microorganism. The biochemical profiles of the strains are shown in Table 1, comparing them with the biochemical profiles of the species to which they correspond, where it is represented by the symbol “+” if they metabolized the corresponding substance and with the symbol “-” in case they did not, thus generating the profiles of each strain.

According to the biochemical reactions of the “API step 20” system (bioMérieux), strain “1” was identified as *Leuconostoc* spp. The “API 20 step” system does not identify species of the genus *Leuconostoc*; however, García *et al.* (2004) shows that the species of the genus that metabolize the lactose found in dairy products and its derivatives that have been found in raw milk are *L. mesenteroides*, *L. lactis* and *L. argentinum*; therefore the strain must belong to one of these three species.

Strains “2” and “3” were adjusted to the profile of *Lactococcus lactis* subespecie cremoris. Koneman (2006); Alais (1985) explain that this homofermentative mesophilic species is the most widely used in dairy products, mainly in cheeses. Also Del Castillo *et al.* (2004) report that *Lactococcus lactis* subespecie cremoris is a desirable species as it gives organoleptic properties to the product; in addition to providing a presumptive protective effect against pathogens.

Rodríguez (2007) found that 22% of isolated BAL strains from milk and from different artisanal and semi-industrial cheeses belong to the genus *Leuconostoc*, most of which were found in unripened cheeses or 10 days of maximum ripening and with pH between 4.6 and 6.3, similar conditions to the cheese used for the BAL isolation in this study.

Cuadro 1. Identificación de las tres cepas de BAL aisladas de queso panela artesanal genuino mexicano de leche sin pasteurizar, de acuerdo a las pruebas bioquímicas del sistema “API step 20”.

Table 1. Identification of three BAL strains isolated from genuine Mexican artisanal panela cheese from unpasteurised milk, according to the biochemical tests of the “API step 20” system.

Prueba	Cepa 2	Cepa 3	<i>Lactococcus lactis</i> subespecie cremoris	Cepa 1	<i>Leuconostoc</i> spp.
VP	+	+	+	+	+
HIP	+	-	-	-	-
ESC	+	+	(-) ó (+)	+	(-) ó (+)
PYRA	-	-	-	-	-
αGAL	-	-	-	-	-
βGUR	-	-	-	-	-
βGAL	-	-	-	-	(-) ó (+)
PAL	-	-	-	-	-
LAP	-	+	+	+	+
ADH	+	-	-	-	-
RIB	-	-	-	-	-
ARA	-	-	-	-	-
MAN	-	-	-	-	-
SOR	+	+	-	-	-
LAC	+	-	+	+	-
TRE	+	-	-	+	(-) ó (+)
INU	-	-	-	-	-
RAF	-	-	-	-	-
AMD	-	-	-	-	-
GLYG	-	-	-	-	-

+ = el microorganismo respondió positivamente a la prueba; - = el microorganismo respondió negativamente.

Los valores de los parámetros de la cinética de crecimiento mostraron que las tres cepas (1, 2 y 3) crecen muy similarmente (Figura 2). Sin llegar a ser diferente ($p > 0.05$), la fase L. La fase de adaptación de las tres cepas se encuentra en aproximadamente en un lapso de 0 a 168 min de haberse inoculado, siendo la tercera cepa seleccionada (identificada como *Lactococcus lactis* subespecie cremoris) la que mostró una mayor velocidad de adaptación; la fase exponencial de ésta se encuentra aproximadamente entre este punto y hasta los 360 min, a partir de ese punto y hasta los 615 se encuentra la fase estacionaria (Figura 2).

Como se puede notar en el Cuadro 2, la cepa 1 tiene en promedio un desarrollo más rápido en general ($S = 5.4 \cdot 10^{-3}$); sin embargo, alcanza concentraciones un poco más bajas que las otras. La cepa que mayor DO alcanza es la tres (DO m=

The values of the growth kinetics parameters showed that the three strains (1, 2 and 3) grow very similarly (Figure 2). Without a different L phase ($p > 0.05$). The adaptation phase of the three strains is found in approximately 0 to 168 min after being inoculated, the third strain being selected (identified as *Lactococcus lactis* subespecie cremoris) which showed a higher adaptation rate; its exponential phase is approximately between this point and up to 360 min, from that point to 615 is the stationary phase (Figure 2).

As shown in Table 2, strain 1 has a faster overall development on average ($S = 5.4 \cdot 10^{-3}$); however, it reaches lower concentrations than the others. The strain that reaches a highest DO is strain three (DO m= 1.14) and is also the one that fastest reaches the exponential

1.14) y es también la más rápido alcanza la fase exponencial (L= 113). Asimismo, los rangos a los que se encuentran cada una de las cepas en sus diferentes fases son prácticamente las mismas.

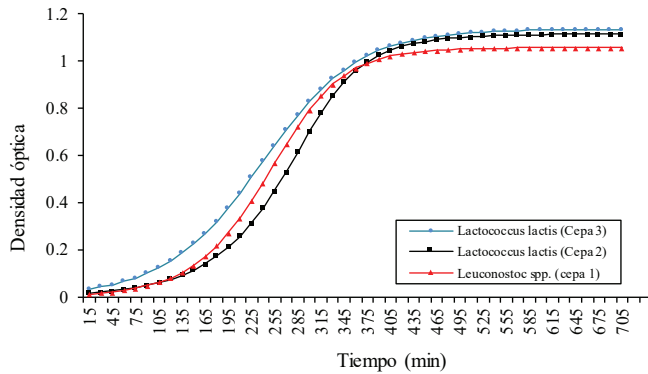


Figura 2. Curva ajustada de crecimiento de BAL en caldo MRS medido en densidad óptica.

Figure 2. Adjusted BAL growth curve in MRS broth measured in optical density.

Las cepas muestran un rápido desarrollo y un crecimiento bastante alto, crecimiento que es explicable ya que fue en condiciones muy cercanas a las idóneas para el desarrollo de esta especie, éstas son una temperatura de 37 ± 2 °C, en anaerobiosis y en un medio sintético enriquecido con los nutrientes ideales para su metabolismo. En un medio con características tan complejas como lo es el queso en el que las condiciones no son tan aproximadas a las idóneas para las BAL, la tasa de crecimiento puede ser mucho menos rápida.

Conclusiones

El queso panela de Atengo, Jalisco, contiene alta población de BAL mayor a 1×10^6 UFC g^{-1} , las cuales además de conferirle propiedades sensoriales, de conservación, tecnológicas al producto, pueden participar en el control de patógenos como *Salmonella enterica* var. Typhimurium. De un total de 55 aislamientos bacterianos, 31 resultaron ser BAL de las cuales ocho mostraron efecto inhibitorio leve contra *Salmonella enterica* var. Typhimurium y tres, efecto más severo. Éstas últimas fueron *Leuconostoc* spp, y *Lactococcus lactis* subespecie cremoris, con características de crecimiento que le permiten alcanzar su máximo crecimiento entre 8 y 9 h de incubación que las hace competitivas contra *Salmonella enterica* var. Typhimurium.

phase (L= 113). Likewise, the ranges to which each of the strains in their different phases are found are practically the same.

Cuadro 2. Parámetros de la cinética de crecimiento de tres BAL aisladas de queso panela artesanal genuino mexicano de leche sin pasteurizar de Soyatlán del Oro, Jalisco, con capacidad antagonica contra *Salmonella enterica* var. Typhimurium.

Table 2. Parameters of the growth kinetics of three BALs isolated from Mexican genuine artisanal panela cheese from unpasteurized milk from Soyatlan del Oro, Jalisco, with antagonistic capacity against *Salmonella enterica* var. Typhimurium.

Cepa	Parámetro					
	DO m		S		L	
1	1.06	a	5.4×10^{-3}	a	151	A
2	1.12	a	5.5×10^{-3}	a	168	A
3	1.14	a	4×10^{-3}	a	113	A

DO m= crecimiento máximo; S= tasa de crecimiento; L= adaptación. Medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas $\alpha= 0.05$.

The strains show a rapid development and a fairly high growth, a growth that is explicable since it was performed in conditions very close to the ideal ones for the development of this species, these are a temperature of 37 ± 2 °C, in anaerobiosis and in a synthetic medium enriched with the ideal nutrients for its metabolism. In a medium with such complex features as cheese in which the conditions are not as close to those suitable for BALs, the growth rate may be much less rapid.

Conclusions

The Panela cheese from Atengo, Jalisco, contains a high BAL population greater than 1×10^6 UFC g^{-1} , which in addition to conferring sensory, conservation and technological properties to the product, can participate in the control of pathogens such as *Salmonella enterica* var. Typhimurium. Of a total of 55 bacterial isolates, 31 were found to be BAL of which eight showed mild inhibitory effect against *Salmonella enterica* var. Typhimurium and three a more severe effect. The latter were *Leuconostoc* spp., and *Lactococcus lactis* subspecies cremoris, with growth characteristics that allow it to reach its maximum

Se debe investigar la función del consorcio de BAL inhibitorias en su conjunto y no solo de forma aislada, para determinar si existe efecto sinérgico que potencialice la inhibición de patógenos. También, al comprobar que había BAL presentes en el queso artesanal con actividad antagonica en contra de un patógeno como salmonella, se aportaron pruebas de que la fermentación acidoláctica, generada por estas, es una alternativa a la pasteurización de la leche del proceso quesero y que debe ser considerada dentro de las normas en México.

Literatura citada

- Aguilar, C. y Klotz, B. 2008. Inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* por bacterias ácido lácticas: presencia de quórum sensing? Alimentos hoy. Colombia. 13(13):345-356.
- Alais, Ch. 1985. Ciencia de la leche. Editorial Reverté. Cuarta edición. España. 873 p.
- Arispe, I. y Tapia, S. 2007. Inocuidad y calidad: requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. Agroalimentaria. Venezuela. 1(13):105-118.
- Cervantes, F.; Villegas, A.; Cesin, A. y Espinoza, A. 2008. Los quesos genuinos mexicanos: patrimonio que debe rescatarse. Mundi- prensa. México. 186 p.
- Del Campo, C.; Gómez, H. y Alaniz, R. 2008. Bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. e-Gnosis. 6(5):1-17.
- Del Castillo, R. y Mestres, J. 2004. Productos lácteos. Tecnología. UPC, España. 228 p.
- Díaz, M. 2005. Proceso básico de la leche y queso. Revista Digital Universitaria DGSCA-UNAM, México. 6(9).
- García, M.; Quintero R. y López A. 2004 Biotecnología alimentaria. LIMUSA. México, D. F. 636 p.
- INS. 2014. Protocolo de vigilancia en salud pública: fiebre tifoidea y paratifoidea. INS. Colombia. 35 p.
- Jay, J.; Loessner, J. and Golden, D. 2006. Modern food microbiology. Springer. USA. 790 p.
- Koneman, E. 2006. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Lippincott. EUA. 1565 p.
- Klenhamer, T. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimic. 70(3):337-49.
- Larios, E. 2007. Caracterización de la microflora del queso tipo Oaxaca y su actividad antimicrobiana. UAEH, México. 33(2): 25-26 p.
- Longo, D. 2013. Harrison: gastroenterología y hepatología. McGraw Hill. México. D. F. 735 p.
- Makras, L.; Triantafyllou, V.; Fayol, M. D.; Adrian, T.; Zoumpoulou, G.; Tsakalidou, E.; Servin, A. and De Vuyst, L. 2005. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* var. Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. Res. Microbiol. Elsevier. 157(3):241-247.
- Mataragas, M. 2003. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4 ± 2 °C. Invitrogen. Elsevier. 93(3):363-373.
- growth between 8 and 9 h of incubation that makes them competitive against *Salmonella enterica* var. Typhimurium.
- The role of the inhibitory BAL consortium as a whole and not only in isolation should be investigated to determine if there is a synergistic effect that potentiates the inhibition of pathogens. Also, when there was BAL present in artisanal cheese with antagonistic activity against a pathogen such as salmonella, evidence was provided that the acidolactic fermentation, generated by these, is an alternative to the pasteurization of milk for the cheese processing and that should be considered within the standards in México.

End of the English version



- MacFaddin, J. 2000. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia química. Editorial Panamericana, México, D. F. 850 p.
- NOM. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Secretaría de Gobernación. México, D. F.
- OMS. 2013. Salmonella (no tifoidea). Nota descriptiva N° 139 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>.
- Palomino, C. T. 2012. Biopreservación de productos pesqueros por bacterias ácido lácticas (bal). Vitae. Colombia. 19(1):108-110.
- Parra, R. 2010. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Colombia. 8(1):93-105.
- Peláez, T. 2005. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. Science direct. Elsevier. 15(1):832-844.
- Pérez, A. y Aguilar, P. 1999. Fiebre tifoidea caracterización epidemiológica. Situación mundial y en Cuba. VaccinMonitor, Cuba. 8(6):1-10.
- Piña, M.; Uribe, C.; Regalado, C.; Amaya, S.; Castaño, E. y García, B. 2011. Producción de nisina por *Lactococcus lactis* uq2 usando suero lácteo suplementado y evaluación de su actividad después del secado por aspersión. Ciencia. 4(2):47-55.
- Ramírez, S. 2008. Aislamiento y detección de la actividad antimicrobiana de bacterias acidolácticas. In: memorias del VII congreso nacional de tecnología en alimentos. Guanajuato, México. 163-370 pp.
- Saidi, N. 2011. Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from west algerian goat's milk. Algeria Global J. Biotechnol. 6(3):154-161.
- Scaramelli, A.; Citti, R.; Gonzáles, L.; Páezm, L. y Tromp, J. 1999. Investigación de *Salmonella* sp. en muestras de quesos blanco duro "tipo llanero" del estado de Aragua, Venezuela. Revista científica FCV-Luz. 10(3):167-173.
- Spreer, E. 1978. Technologie der Milchverarbeitung. Editorial VEB, España. 568 p.

Rodríguez, L. 2008. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belen (Boyaca). Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia. <http://repository.lasalle.edu.co/handle/10185/6561>.

Ruth, L.; Delgado, C.; Dora, J. y Torres, M. 2003. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. Lima, Perú. Rev. Panam. Salud Pública. 14(3):158-164.