



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE ENCURTIDOS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS.

Alumno/a: Navas Molina, Antonio Jesús

Tutor/a: Prof. D. Rubén Pérez Pulido

Prof. D. María José Grande Burgos

Dpto: Ciencias de la Salud. Área de Microbiología.

Octubre, 2018

INDICE

1. Resumen/Abstract	4
2. Aspectos generales	6
3. Encurtidos.....	7
3.1. Proceso de fabricación.....	8
3.1.1. Materia prima.....	8
3.1.2. Selección	8
3.1.3. Calibrado	9
3.1.4. Lavado	9
3.1.5. Fermentación.....	10
3.2. Control de la fermentación	15
4. Bacterias ácido-lácticas (BAL).....	17
4.1. Clasificación de las BAL.....	18
4.1.1. <i>Lactobacillus</i>	18
4.1.2. <i>Streptococcus</i>	19
4.1.3. <i>Carnobacterium</i>	19
4.1.4. <i>Pediococcus</i>	20
4.1.5. <i>Lactococcus</i>	20
4.1.6. <i>Leuconostoc</i>	21
5. Encurtidos analizados.....	22
6. Levaduras.....	24
7. Antimicrobianos	27
8. Objetivos.....	38
9. Materiales y métodos.....	39
9.1. Preparación de las muestras.....	39
9.2. Elaboración de los medios de cultivo	39
9.2.1. Medios sólidos	39

9.2.2. Medios líquidos	41
9.3. Metodología	42
9.3.1. Siembra en placa y aislamiento de colonias	42
9.3.2. Tinciones	42
9.3.3. Resistencia a antibióticos	43
9.3.4. Resistencia a biocidas	43
9.3.5. Extracción de ADN	45
10. Resultados y Discusión	46
11. Conclusiones	62
12. Bibliografía.....	64

1.- RESUMEN

Hoy en día, la resistencia bacteriana sobre los distintos antimicrobianos, tales como biocidas o antibióticos, conlleva una gran amenaza para la seguridad alimentaria, el desarrollo y la salud pública. Este, es uno de los mayores problemas que crece a diario y que actualmente el mayor número de la población en España no es consciente de ello. Los últimos datos hablan del fallecimiento de unas 35.000 personas en España, según denuncia la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Las bacterias resistentes pueden provocar diversas infecciones tanto en humanos como en animales y supone un gran reto poder combatir contra ellas, dada la resistencia que pueden llegar a presentar a un elevado número de antibióticos diferentes.

Durante el presente estudio, se trató de aislar bacterias resistentes a diferentes antibióticos procedentes de alimentos encurtidos, tales como pepinillos, aceitunas o berenjenas. Tras una primera selección de colonias ya resistentes al medio en el que fueron cultivados a algunos de los antibióticos como Ampicilina o Tetraciclina, se volvieron a sembrar algunas de las colonias resistentes con discos de diferentes antibióticos. Las colonias que concedían esta resistencia fueron identificadas finalmente por medio de la técnica de la PCR. Además, también se llevaron a cabo ensayos con placas de microtitulación para poder observar la resistencia de la selección de colonias a distintos biocidas.

Abstract

Actually, bacterial resistance to different antimicrobials, such as biocides or antibiotics, carries a great threat to food security, development and public health. This is one of the biggest problems that grows daily and that currently the largest number of the population in Spain is not aware of it. The latest data speak of the death of some 35,000 people in Spain, as reported by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). Resistant bacteria can cause various infections in both humans and animals and is a great challenge to combat against them, given the resistance that can come to present a high number of different antibiotics.

During the present study, we tried to isolate bacteria resistant to different antibiotics from pickled foods, such as cucumber, olives or aubergine. After a first selection of colonies already resistant to the medium in which they were cultivated to some of the antibiotics such as Ampicillin or Tetracycline, some of the resistant colonies were checked again with discs of different antibiotics. The colonies that granted this resistance were finally identified by means of the PCR technique. In addition, tests were also carried out with microtitre plates to be able to observe the resistance of the selection of colonies to different biocides.

2.- ASPECTOS GENERALES

La técnica de encurtir es un método antiguo utilizado para conservar y mantener frutas y vegetales. En la actualidad, cada vez son más los fabricantes de encurtidos y condimentos los que han cobrado importancia en las industrias y el sector alimenticio. Aunque la conservación de vegetales y frutas encurtidas da comienzo como un “arte doméstico”, hoy en día la mayoría de los proveedores de encurtidos del mundo se elaboran en grandes superficies comerciales. Cualquier vegetal o fruta puede encurtirse, sin embargo, la calidad de algunos alimentos encurtidos es pobre (Thomas y Holly Berry, 1999). Los principales ingredientes empleados para elaborar productos encurtidos incluyen sal, vinagre (ácido acético), azúcar, especias y agua. El proceso de elaboración requiere de la inmersión del alimento (materia prima) en una salmuera que contenga ácido acético (vinagre) y sal, para posteriormente someterlos a un tratamiento térmico. Algunos ingredientes como azúcar y especias son utilizados para adicionar una mejora en el sabor. Por lo tanto, la sal, ácido acético y calor son los principales factores para aumentar la seguridad microbiana de alimentos encurtidos.

Por otro lado, la resistencia bacteriana frente a los antibióticos o biocidas es cada vez más evidente y muchas de las causas que hacen posible que esto ocurra es el exceso de prescripción de antibióticos, el uso excesivo de antibióticos en crías de ganado y pescado, el control inadecuado de las infecciones en los hospitales y clínicas, la falta de higiene y saneamiento deficiente, dejar los tratamientos por parte de los pacientes antes de haberlo acabado o simplemente la falta de desarrollo de los nuevos antibióticos entre otros. Desde que comenzó el uso generalizado de antibióticos en los años 50, prácticamente todos los patógenos han desarrollado algún tipo de resistencia. Algunos requieren dosis cada vez más elevadas de antibiótico para que el tratamiento sea efectivo. Y otros han desarrollado resistencia a todos los antimicrobianos conocidos, lo que supone un grave riesgo para la salud.

3.- ENCURTIDOS

Los alimentos encurtidos son aquellos que han sido marinados en solución de sal y fermentan por si solos o en algunos casos, ayudados por un inóculo, es decir, por medio de microorganismos tales como el *Lactobacillus plantarum*, el cual produce una bajada del pH y un aumento en la acidez del mismo, con la finalidad de poder alargar su conservación. Estos productos vegetales, tras ser sometidos a diversas transformaciones, tienen en común su condimento con vinagre. Dicho proceso permite mantener y conservar por más tiempo los alimentos, es decir, alargar su vida útil.

Dentro de estos alimentos empleados para la técnica del encurtido, las especies más cultivadas para llevar a cabo dicha técnica son: berenjenas, remolacha, pepinillos, cebollina, guindilla, repollo, rabanillos, aceitunas, alcaparras, etc.

El alimento natural, o lo que es lo mismo, la materia prima, pueden someterse a fermentaciones ácido láctica o directamente no fermentarse. Por lo tanto, según el método utilizado para elaborar el encurtido se producirá fermentación o no. Si se sumerge únicamente en vinagre no habrá fermentación, pero, en caso contrario, si se introduce en salmuera, si habrá fermentación espontánea debido a las bacterias fermentativas que se encuentran en el mismo, transformando los azúcares del vegetal en ácido láctico

La técnica de encurtir logra conservar los productos vegetales durante un mayor tiempo en condiciones óptimas y, además, tiene la ventaja de que sus características nutritivas y organolépticas se mantienen. La elaboración de encurtidos viene condicionada sobre todo por los gustos, las costumbres y las tradiciones, así como la preferencia por sabores ácidos, dulces, picantes o agridulces.

3.1.- Proceso de fabricación

El proceso de fabricación de encurtidos comprende dos fases:

- **Fase de fermentación:** tiene lugar la fermentación ácido-láctica de la materia prima debido a la flora microbiana presente de forma natural en los frutos. Esta fase va acompañada de una serie de operaciones previas preparatorias. Esta fase puede no realizarse, pasando de las operaciones previas a la fase siguiente.
- **Fase de elaboración:** a partir de la materia prima fermentada y conservada en salmuera o bien partiendo de productos en fresco son elaborados los distintos tipos de encurtidos.

La elaboración de encurtidos, data de los siguientes procesos y/o fases (Martínez, 1988):



3.1.1. Materia prima

Partimos desde la materia prima, que no son más que los frutos inmaduros de las especies (citados algunos ejemplos anteriormente). La recolección es un factor importante para hacer distinción sobre el tamaño de estos.

La recolección manual, produce un alto porcentaje de frutos de menor tamaño, lo que genera un mayor rendimiento económico dado su alto aprecio comercial para el consumidor, mientras que una recolección mecanizada, tiende a recoger frutos de mayor tamaño y, por lo tanto, poco apreciados.

3.1.2. Selección

Proceso de vital importancia dado que ayuda a incrementar la calidad de la materia prima preparada para fermentar. Se eliminan las posibles hojas y flores que puedan quedar adheridos al fruto de forma mecánica, mediante unos rodillos de caucho que atrapan las flores y restos de la materia vegetal, que normalmente

pueden presentar hongos y son los principales causantes del reblandecimiento de los frutos. Se ha demostrado que, frutos fermentados con gran cantidad de restos vegetales poseen una mayor actividad enzimática y, como resultado final, el producto es de menor firmeza o blando por lo general.

3.1.3. Calibrado

En esta fase, los frutos son clasificados según su diámetro. Es de vital importancia debido a que va a determinar la aparición o no de ciertas alteraciones en la salmuera y del producto final elaborado. Por esta misma razón, durante la fase anterior, en la selección, es preferible evitar fermentar en el mismo depósito frutos con distinto tamaño ya que, los más grandes, por norma general suelen ser los más maduros y van a fermentar con mayor rapidez que los pequeños, por lo que descompensa el tiempo en el proceso de la fermentación, dando como resultado final frutos que no consigan las características precisas de dicha técnica.

3.1.4. Lavado

Proceso llevado a cabo antes de la fermentación. Consiste en realizar un lavado para disminuir la suciedad y los restos de tierra adherida que puedan llevar los frutos. La higiene en el manejo de la materia es fundamental al ser la fermentación ácido-láctica un proceso microbiológico.

Las enzimas pectinolíticas y celulolíticas presentes en los frutos son los causantes del reblandecimiento de los frutos.

El lavado, por tanto, es una operación sencilla de llevar a cabo, ya que se realiza simplemente vertiendo agua sobre los frutos, pero a la vez de gran importancia ya que disminuye el riesgo de que el proceso de fermentación natural se vea alterado.

3.1.5. Fermentación

Sin duda, es el proceso más importante en la elaboración de alimentos encurtidos. Es muy común en una gran cantidad de alimentos, no solo encurtidos, sino que también forma parte en la elaboración del pan, embutidos, quesos o cerveza entre otros. Este proceso, es el responsable de las características finales de los productos fermentados, como bien pueden ser la textura, el sabor o el aroma. También va a depender de este, su prolongación de vida útil o los beneficios que pueda aportar para la salud (Holzapfel, 2002).

La fermentación, genera unos beneficios sobre los alimentos como pueden ser, el incremento en proteínas, vitaminas o aminoácidos esenciales. Además, ayuda en la digestión de proteínas y fibras, aumenta la biodisponibilidad de micronutrientes y degradación de factores antinutricionales, y reduce los efectos tóxicos de los alimentos con la producción de componentes antimicrobianos (Holzapfel, 2002; Hansen, 2002).

La fermentación es un proceso que consiste en colocar las especies de vegetales que se han utilizado para elaborar los encurtidos en solución salina, la salmuera, y esperar que, la flora microbiana que se encuentra asociada de forma natural a la materia prima realice la fermentación. Debemos evitar la actividad microbiana causante de fermentaciones anómalas y crear un medio adecuado y favorable a la fermentación ácido- láctica. Es por esto, por lo que no se utiliza agua solamente para la salmuera (Martínez, 1988).

Llegado a este punto, es cuando entran en juego las bacterias ácido-lácticas y que, gracias a la combinación de dos factores principales, son las causantes de llevar a cabo la fermentación. Estos factores son, la concentración de sal y el descenso del pH.

- La concentración de sal. Inhibe el crecimiento de posibles hongos o bacterias indeseables y selecciona a la mayoría de las bacterias ácido-láctica (Jones, 1997).

- Descenso de pH debido a la producción de ácido láctico por las bacterias fermentativas.

Durante este proceso, se van a producir cambios tanto químicos como físicos, además de los microbiológicos en los alimentos (Martínez, 1988). Todo esto se lleva a cabo en los depósitos donde se van a mantener y que se desarrolla en condiciones de anaerobiosis.

➤ **Cambios químicos**

El cambio más importante en este proceso es la transformación de los azúcares que se encuentran presentes en los vegetales en ácido acético mediante la acción bacteriana. A pesar de que en la fermentación el ácido láctico es el principal producto, también se sintetizan pequeñas cantidades de ácido acético.

A medida que aumenta la producción de ácido láctico, desciende el pH inicial de la salmuera (6,5 - 7), pasando a valores entre 3,4 y 3,8, pero nunca superior a 4.

➤ **Cambios físicos**

Los azúcares, minerales, proteínas y resto de sustancias contenidas en los vegetales van a difundir por ósmosis en la salmuera durante los primeros 2-3 días. Estas sustancias, constituyen el alimento para las bacterias productoras de ácido láctico, fermentadoras y de otros microorganismos. Como consecuencia, los frutos van a comenzar a arrugarse y disminuir su peso.

A continuación, la sal pasará al interior de los tejidos provocando la entrada de agua al interior del vegetal, lo que recompondrá de nuevo el peso del vegetal volviendo a su aspecto original. El cambio de textura durante la fermentación es de gran importancia ya que va a determinar las diferencias cualitativas entre los encurtidos procedentes de vegetales fermentados y de frescos. La textura de los

encurtidos preparados sin fermentación previa es dura, mejorándose en gran medida con la fermentación.

➤ Cambios microbiológicos

En cuanto a los cambios microbiológicos, los microorganismos más importantes que participan durante la fermentación son:

- Bacterias productoras de ácido láctico
- Bacterias productoras de gases
- Levaduras

Todos estos microorganismos se encuentran de forma natural en los alimentos. A medida que va descendiendo la concentración de la salmuera, se va inhibiendo el desarrollo de las bacterias productoras de gases debido a la formación de ácido láctico.

Las bacterias productoras de ácido láctico son las responsables de los mayores cambios en los frutos. No obstante, presentan variaciones estacionales y de distribución. Las más destacadas podrían ser:

- *Leuconostoc mesenteroides*, predomina en los primeros momentos de la fermentación.
- *Streptococcus fecalis*, tiene fermentación de tipo homoláctico, transformando la lactosa en ácido láctico.
- *Pediococcus cerevisiae*
- *Lactobacillus brevis*, contribuye a la formación de ácido láctico y también es productora de gas.
- *Lactobacillus plantarum* es la bacteria más importante a la hora de producir ácido láctico.

Normalmente estas son las BAL más comunes en la fermentación de vegetales como aceitunas, pepinos o chucrut, aunque no son las únicas presentes. (González, 1963; Vaughn, 1982; Fleming, 1984).

Dentro del grupo de las bacterias productoras de gases tenemos varias especies:

- Coliformes del género *Aerobacter*, caracterizadas por la producción de anhídrico carbónico e hidrógeno.
- *Lactobacillus brevis*.

Las levaduras pueden dividirse en dos grupos:

- Levaduras oxidativas o formadoras de película en la superficie de la salmuera. Consumen ácido láctico por oxidación. Dentro de este grupo están los géneros:
 - *Debaryomices*,
 - *Endomycopsis*
 - *Candida*

Es muy importante la eliminación de estas levaduras ya que podría aumentar el pH de la salmuera y de esta forma, aumentar la presencia de organismos sensibles al ácido que causan la putrefacción. (Nout y Rombouts, 1992)

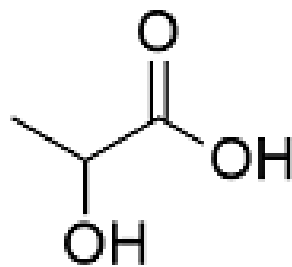
- Levaduras que desarrollan su actividad en la masa de salmuera y fermentan restos de azúcares, produciendo una fermentación gaseosa y alcohol. Pertenecen a este grupo:
 - *Torulopsis*
 - *Brettanomyces*
 - *Zygosacharomyces*
 - *Hansenula*

- *Kloeckera*.

El ácido sórbico inhibe la actividad de estas levaduras.

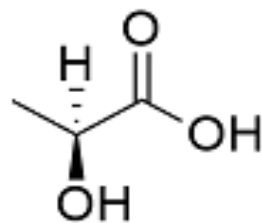
La fermentación láctica es producida por las bacterias ácido-lácticas y su actividad se desarrolla en condiciones de anaerobiosis. Se manifiesta en el proceso de transformación de los azúcares presentes en la muestra vegetal en ácido láctico, etanol y dióxido de carbono.

El ácido láctico es un compuesto incoloro cuya fórmula es:

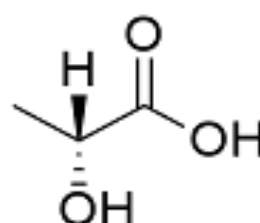


Ácido láctico

Es un líquido viscoso y no volátil, cuya masa molecular es de 90,08. Este producto se da bajo formas ópticamente activas, dextrógiras y levógiras, llamadas ácido D - Láctico y ácido L – Láctico respectivamente. El ácido láctico en su estado natural es una mezcla ópticamente inactiva formada por partes iguales de ambas formas D y L, conocida como mezcla racémica.



L- (+)-Láctico



D- (-)-Láctico

En esta etapa también se pueden producir microorganismos responsables de la putrefacción del alimento, como pueden ser propionilbacterias y clostridios, que degradan el ácido láctico en el caso de que la concentración de sal y ácido es demasiado baja o si el pH es demasiado alto. También se pueden desarrollar levaduras oxidativas, hongos y bacterias en una etapa post-fermentación (Fleming, 1991).

3.2. Control de la fermentación.

Para realizar una fermentación en perfectas condiciones, hay que llevar un control exhaustivo de la técnica, tanto del alimento con el que trabajamos como el de los productos que la hacen posible. Así que, el control de los microorganismos de la alteración depende del tipo de producto encurtido, pero generalmente se consigue de la siguiente manera:

- Control del pH: la acidez, es uno de los parámetros que más se controla, tanto libre como total, para garantizar el éxito de la fermentación (Panagou y Tassou, 2006).
- Una distribución adecuada de la sal o composición de salmuera: la concentración de sal de las salmueras es uno de los parámetros principales. No solo implica que se lleve a cabo una correcta fermentación favoreciéndola desde el principio, sino que, además, debe mantenerse constante y renovarse en el caso de que fuese necesario (Özay y Borcakli, 1995; Montaña et al., 2003; Bobillo y Marshal, 1991).
Una baja concentración de sal favorece el crecimiento de bacterias lácticas mientras que valores elevados estimulan el crecimiento de levaduras (Tassou et al., 2002)
- Uso de cultivo indicadores.

- Mantenimiento de la temperatura apropiada durante la fermentación: (Tassou et al, 2002), pusieron de manifiesto la importancia de la temperatura en los procesos de fermentación. El empleo de temperaturas muy altas para la preservación del vegetal está basado en su efecto destructor en los microorganismos (Jay, 1992).
- Destrucción o inhibición de la actividad de levaduras oxidativas: Se puede conseguir cubriendo totalmente la superficie del tanque para excluir el oxígeno.

4. BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (BAL)

En general, las bacterias lácticas son cocos o bacilos Gram positivos, no móviles, no esporulados, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes, oxidasa, catalasa y bencidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr et al., 2002; Vázquez et al., 2009).

Las bacterias ácido-lácticas o BAL, presentan múltiples aplicaciones, pero la más importante es la fermentación de alimentos tales como leche, vegetales o carne, para obtener productos finales como son el queso, yogurt, encurtidos, embutidos, etc.

Forman parte también de la gran mayoría de los probióticos. Los probióticos son bacterias vivas y levaduras que residen en nuestro cuerpo, y que son buenas para la salud, especialmente para la del sistema digestivo. Aunque la connotación de bacterias parece reflejar causa enfermedades, en este caso, su significado es totalmente contrario: los probióticos son bacterias que ayudan a mantener la microbiótica saludable. Al ser consumidos por hombres o animales en las cantidades adecuadas, mejoran las propiedades de la microflora activa. Estos cultivos se usan en la industria alimentaria, para la elaboración de productos fermentados y como complementos alimenticios con el fin de promover la salud (Ramírez et al., 2011). Los probióticos, en la gran mayoría de los casos, se emplean para estimular la salud intestinal y el sistema inmunológico (Fuller, 1989). Son conocidos más de 20 especies distintas de microorganismos probióticos, de los cuales, pueden ser aislados de diferentes tipos de materiales; desde el tracto intestinal humano y de animal, hasta de carnes, frutas y productos fermentados (Gilliland, 1990; Barboza et al., 2004).

Los microorganismos que predominan pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*. (Ogueke, 2010).

Los probióticos son útiles para el control de infecciones en el intestino por patógenos entéricos, combatir el desarrollo de la microflora nativa en el intestino, además de, el control de infecciones en el tracto urogenital y para combatir la intolerancia a la lactosa. Por otro lado, estimula el sistema inmune y el

movimiento intestinal y también se emplean para reducir la incidencia de diarreas, de tumores y el colesterol sérico y enfermedades cardíacas (Ramírez et al, 2011).

4.1 Clasificación de las bacterias lácticas

El grupo de BAL, está comprendido por unos 20 géneros aproximadamente. Los géneros más representativos son los siguientes (Davidson et al., 1995; Axelsson, 2004):

<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lastosphaera</i>
<i>Tetragenococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Oenococcus</i>	<i>Vagococcus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Weissella</i>

Todos comparte la propiedad de producir ácido láctico a partir de las hexonas (Jay, 2010). Los géneros de mayor relevancia en la microbiología de los alimentos son los siguientes (Wood y Holzapfel, 1995).

4.1.1 *Lactobacillus*

Presentan forma bacilar, variando desde bacilos cortos y curvados a largos y delgados, no esporulados, acidúricos o acidófilos, anaerobios o aerotolerantes, y de requerimientos nutricionales complejos. Los límites de temperatura para desarrollar oscilan entre 2 a 53°C con temperaturas óptimas entre los 30 a 40° C (Jay, 2000; Madigan et al., 2004).

Es el grupo más grande comprendido con 80 especies reconocidas y organizados según sus características fermentativas en tres grupos (Jay 2000; Axelsson, 2004).

- Grupo 1: Especies homofermentativas estrictas

- Grupo 2: especies heterofermentativas facultativas
- Grupo 3: heterofermentativas estrictas

Las bacterias de este género son indispensables para la industria alimentaria, sobre todo para la industria láctea. Se usan, para producir alimentos vegetales fermentados como chucrut o encurtidos, para bebidas como vino o cerveza, para quesos, yogurt y embutidos.

No obstante, también causan algunos problemas en estos alimentos ya que son ocasionalmente responsables del deterioro de la cerveza, la carne o la leche (Prescott et al., 1999)

4.1.2. *Streptococcus*

Forma de cocos (de 0.8 a 1.2 micrómetros) y anaerobios facultativos. Se agrupan formando cadenas de hasta más de 50 células o pares y presentan una considerable actividad superóxido dismutasa. Presentan una compleja necesidad de factores para su desarrollo tales como, aas, péptidos, bases tanto púrica como piridínicas y Vitamina B1. Esta es la razón por la que se encuentran de manera abundante en medios ricos como la leche (Wood y Holzapfel, 1995). Por lo tanto, es evidente que juegan un importante papel como productores de ácido láctico en la producción de leches fermentadas (Casp y Requena, 1999; Madigan et al., 2004).

4.1.3. *Carnobacterium*

Se trata de bacilos Gram Positivos. De tamaño entre 0.5 – 0.7 x 1.1 – 3.0 micrómetros. Catalasa negativos, psicrótrofos creciendo la mayoría a 0° C, mientras que a 45° C no crecen. Son homofermentativos en cuanto a su metabolismo y producen gas a partir de la glucosa.

Se diferencian de *Lactobacillos* principalmente por ser incapaces de crecer en medios con acetato y sintetizar ácido oleico.

En alimentos podemos encontrarlos en carnes de aves de corral además de en pescados. (Wood y Holzapfel, 1995).

4.1.4. *Pediococcus*

Cocos Gram Positivos. Anaerobios facultativos y catalasa negativos. Homofermentativos, crecen en salmueras con concentraciones salina de hasta un 5.5%, por lo tanto, su crecimiento es escaso en salmueras cuyas concentraciones sean superiores. Fermentan azúcares para producir una concentración de ácido comprendido entre 0.5% y 0.9%.

Temperatura óptima para su crecimiento está comprendida entre 25 y 32° C, aunque también lo hacen desde los 7 hasta los 45° C.

Pueden ser deterioradores de la sidra o cerveza, realizando una infección que enturbia y acidifica. Algunas cepas son productoras de bacteriocinas (Wood y Holzapfel, 1995; Fernández, 2000; Jay, 2000).

4.1.5. *Lactococcus*

Cocos no esporulados, crecimiento entre 10° C hasta 45° C. Son inmóviles y se encuentran en parejas o cadenas cortas. Catalasa negativos, anaerobios facultativos y homofermentativos. Presentan necesidades nutricionales complejas. Antiguamente, durante las primeras clasificaciones de dichos organismos, fueron incluidos en el género *Streptococcus* pero fueron relevados a la categoría de género.

En 1873, fue aislada por primera vez *Lactococcus lactis subesp. Lactis* en leche fermentada, reconociéndose, como el agente primario en la acidificación de leche coagulada. Es la BAL más frecuente utilizada como cultivo iniciador en la obtención de productos lácteos, concretamente en quesos y derivados lácteos (Leveau y Bouix, 2000).

4.1.6. *Leuconostoc*

Cocos Gram Positivos. Anaerobios facultativos y catalasa negativos. Pueden presentarse tanto en cadenas como dispuestos en parejas. De forma alargada o elíptico. Heterofermentativos, cuya temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 20 y 30° C.

Se pueden aislar tanto de plantas, como ensilados o leche. Se emplean sobre todo en la industria láctea y en la fermentación de verduras tales como coles y pepinillos.

Las especies de *Leuconostoc* también están implicadas en el deterioro de alimentos ya que, soportan concentraciones muy altas de azúcares, lo que facilita su multiplicación, constituyendo de esta forma, un importante problema en las refinerías de azúcar (Jay, 2000; Madigan et al., 2004; Prescott et al., 1999).

5. ENCURTIDOS ANALIZADOS

Para el desarrollo de este ensayo, he utilizado varios encurtidos obtenidos de dos grandes superficies alimenticias.

Los alimentos empleados han sido los siguientes:

- **Aceitunas.** Las aceitunas, son el fruto de la oliva, perteneciente a la familia Oleaceae. Estas, proporcionan algunos beneficios como son:
 - Favorecen la digestión
 - Previenen enfermedades cardiovasculares
 - Facilita el vaciamiento de la vesícula biliar
 - Acción antioxidante

La pulpa de este fruto presenta un 80% de ácido oleico. Este ácido es un ácido graso que genera una serie de beneficios sobre los vasos sanguíneos, ejerciendo así una importante labor sobre la prevención de enfermedades cardiovasculares ya que reduce los triglicéridos plasmáticos (LDL- colesterol y colesterol total) y aumenta el colesterol HDL (colesterol bueno).

Estos frutos, pueden consumirse de dos formas, tanto en aceite como en fresco una vez llevado a cabo el proceso de fermentación. Durante el inicio de la fermentación predominan los géneros *Enterococcus*, *Pediococcus* y/o *Leuconostoc*, que compiten con la microbiota Gram positiva, pero a medida que avanza el proceso van disipándose y predominando otras bacterias, por lo que al final de este, encontramos generalmente *Lactobacillus* (Fernández et al., 1993; Harris, 1998).

Además, son fuente de fibra, siendo ésta muy digestiva para el organismo. En cuanto a su contenido mineral, hay que destacar su aporte de Na que forma parte de la salmuera. Aportan pequeñas cantidades de vitaminas, concretamente la vitamina B y E, siendo la vitamina E de mayor importancia ya que, al igual que el ácido oleico, evita la oxidación de lipoproteínas y de otras sustancias que favorecen el desarrollo de cáncer.

- **Pepinillos.** El pepinillo es un pepino inmaduro, conocidos también como “pepinos cortos”, que se comercializan como encurtidos tras ser sometidos a una fermentación ácido-láctica. El pepino pertenece a la familia de las cucurbitáceas y se consume en forma de encurtido por su resistencia a altas temperatura y elevadas concentraciones salinas (Fleming, 1984).

El microorganismo encargado de llevar a cabo este proceso es *Lactobacillus plantarum*. El pepinillo, al estar fermentado no aporta los mismos nutrientes que el pepino fresco, pues el aporte nutricional que aporta es algo más bajo, aunque podemos destacar su contenido en sodio, vitamina B₆ y ácido ascórbico que tiene poder antioxidante (Rozano et al., 2004). También puede servir para la prevención de tumores gracias a su poder antioxidante (Astiasarán y Martínez, 2000).

- **Berenjenas.** Las berenjenas son una planta herbácea anual, que contienen un bajo porcentaje de azúcares, grasas y proteínas, pero si, un alto porcentaje en agua, por lo que no presentan mucho aporte calórico. Podemos encontrar algunas vitaminas como provitamina A o vitamina C. El mineral más abundante es el K, aunque también presentan Ca, Mg y P.

Tiene una sustancia llamada solanina que es tóxica y puede provocar migrañas y alteraciones gastrointestinales por lo que no se debe consumir en estado crudo.

6. LEVADURAS

Las levaduras, son organismos unicelulares muy importantes para el sector industrial y biotecnológico. Esenciales para la producción de algunos alimentos y bebidas como pan, vino, sidra o cerveza. Pueden estar involucradas en la degradación de algunos alimentos, por procesos de fermentación o contaminación durante la poscosecha de frutas (Senses-Ergul et al, 2005).

En cuanto a su clasificación, estos microorganismos se encuentran clasificados dentro de los Ascomicetos y Basidiomicetos, no obstante, las levaduras no forman un grupo muy definido, ya que no son una entidad taxonómica natural que guarde uniformidad morfológica (Sarmiento y Herrera, 2003).

Algunas características fisiológicas de estos microorganismos:

- **Temperatura.** La temperatura de crecimiento o desarrollo de la mayoría de las levaduras oscila entre los 5 y 37° C, siendo su valor óptimo hasta los 28° C. No obstante, estas cifras, no son rigurosamente las óptimas de su crecimiento cuando se encuentran en sus condiciones ambientales naturales (Villamil y Zapata, 1999). Por ejemplo, las levaduras que se encuentran en la superficie de las hojas, pueden llegar a estar expuestas a unas temperaturas máximas de hasta 55° C bajo condiciones de luz intensa y unas mínimas de 5° C durante la noche (Hiriano y Upper, 2000).
- **Oxígeno.** Todas son aeróbicas. Si el oxígeno está presente, éstas pueden crecer eficientemente a partir de carbohidratos del medio para producir la biomasa y CO₂. Cuando no hay oxígeno o éste disminuye, sin embargo, cambian a metabolismo anaerobio o fermentativo, lo que implica que se genere una menor cantidad de biomasa y producción de alcohol (Sarmiento y Herrera, 2003).

El oxígeno, interviene también en la síntesis de esteroides y del ácido nicotínico. Por lo tanto, si estos compuestos se encuentran presentes en el medio, en condiciones de anaerobiosis total las levaduras también pueden desarrollarse. (Sarmiento y Herrera, 2003).

- **pH.** El pH óptimo para el crecimiento de las levaduras oscila entre 4,5 a 6,5. Algunas especies incluso toleran variaciones en torno a 2,8 – 3 a 2 – 8,5. Entre estos, los valores de pH intracelular varían entre 5,8 a 6,8 (Villamil y Zapata, 1999).
- **Ecología.** Ampliamente distribuidas por la naturaleza jugando un papel muy importante en la dinámica biológica y química de los suelos, animales, plantas y agua donde son activas competidoras de nutrientes. Pueden actuar como antagonistas y en asociaciones simbióticas. Al parecer éstas producen ácidos grasos que inhiben el crecimiento de bacterias Gram negativas y otras veces actúan como cooperadores suministrando nutrientes o sustratos degradados a otros microorganismos (Sarmiento y Herrera, 2003).

Sus hábitats principales vienen condicionados por aquellos lugares en los que hay azúcares tales como, frutas, flores o la corteza de los árboles. Algunas especies viven en simbiosis con animales como insectos y otras son patógenas (Villamil y Zapata, 1999).

- **Nutrición.** En cuanto a su crecimiento, necesitan fuentes de carbono orgánico y nitrógeno mineral u orgánico. Incluso algunas, necesitan varias vitaminas como tiamina, inositol, biotina, etc. y otros factores de crecimiento (Villamil y Zapata, 1999). El carbono, es el compuesto más abundante de la célula de levadura (aproximadamente el 50% del peso seco). A su vez, los compuestos carbonados son utilizados por las levaduras como fuente de carbono y energía (Sarmiento y Herrera, 2003). Todas utilizan D-glucosa, D-fructosa y D-manosa. El carbono se puede suministrar en forma de aldehídos, sales de ácidos orgánicos, azúcares, etanol o glicerina, e incluso, en alguna otra forma dependiendo del tipo de levadura (Villamil y Zapata, 1999).
- **Presión Osmótica y Actividad de Agua.** En su mayoría, las levaduras comúnmente crecen mejor en medios que disponen de gran cantidad de agua. De hecho, algunas son osmotolerantes y soportan una actividad de

agua del orden de 0.65, como es el caso de *Zygosacharomyces rouxii* (Villamil y Zapata, 1999).

El efecto de la presión osmótica varía de una cepa a otra. El mecanismo de resistencia de las levaduras en medios con actividad de agua baja se explica por la acumulación en la célula de polioles para minimizar la diferencia de presión osmótica entre la célula y el medio (Sarmiento y Herrera, 2003).

Además, son muchas las levaduras que, en presencia de solutos como son los azúcares o la sal, son capaces de crecer incluso siendo superiores a la mayoría en los que crecen las bacterias. Los valores de A_w pueden variar cuando cambian las propiedades nutritivas del sustrato, T^a , disponibilidad de oxígeno, pH y presencia de sustancias inhibidoras (Villamil y Zapata, 1999).

7. ANTIMICROBIANOS

Los antibióticos son sustancias químicas producidas directamente por microorganismos de distintas especies que mata o impide el crecimiento de ciertos organismos. El origen de estos puede ser:

- Biológico o natural: cuando se obtienen por cultivos de microorganismos (bacterias u hongos).
- Semisintéticos: cuando se ha obtenido de forma natural a partir de un núcleo básico de un agente, pero se modifican características químicas para mejorar sus propiedades.

El concepto antimicrobiano es algo impreciso, ya que además de incluir tanto a antibióticos como antimicrobianos, puede incluir también otros compuestos como los desinfectantes (García et al., 1999). Los antibióticos obtenidos por síntesis química son denominados quimioterápicos o antimicrobianos.

Con el descubrimiento de la penicilina a principios del siglo XIX, en la práctica clínica se fue introduciendo poco a poco un grupo amplio y heterogéneo de fármacos, los llamados antibióticos. Este acontecimiento, marcó el inicio de una nueva etapa en la historia de la humanidad, ya que, ha contribuido un gran avance en el control de las enfermedades infecciosas, salvado millones de personas y aumentado considerablemente la esperanza de vida. Sin embargo, actualmente, existe una amenaza que disminuye la efectividad de los antibióticos, y no es otro que el mecanismo por el cual las bacterias pueden inactivar o disminuir la acción de los agentes antimicrobianos, es decir, la resistencia bacteriana. Por esta razón, los antibióticos se vuelven ineficaces y las infecciones persistirán en el organismo (Cordiés Jackson et al., 1998; del Arco, 2014). La resistencia constituye un grave problema para la salud pública que, además, se va incrementando por el uso erróneo de estos fármacos por parte de la población que los consume (OMS, 2015). Incluso no solo supone un problema para el mismo individuo que la presenta, ya que las cepas resistentes pueden transmitirse a otros individuos provocando infecciones difíciles o imposibles de tratar.

Las bacterias pueden desarrollar resistencias mediante dos tipos de mecanismos: genéticos o bioquímicos (Gonzalez-Zorn et al., 2010; Vignoli y Seija, 2007).

- Mecanismos genéticos. Las bacterias que producen antibióticos cuentan a su vez con genes propios que les proporcionan mecanismos de resistencia contra los compuestos antimicrobianos producidos, pues de no ser así, inhibirían su propio crecimiento. Es la llamada **resistencia intrínseca**. Esto supone que los mecanismos de resistencia a los antibióticos han surgido en paralelo a los propios antibióticos (Gonzalez-Zorn et al., 2010; Vignoli y Seija, 2007). Por otra parte, las bacterias poseen una gran capacidad de adaptación debido a su plasticidad genética y a sus enormes poblaciones, lo que ha favorecido la aparición de nuevos mecanismos de resistencia a los antibióticos a lo largo de los años: es la denominada **resistencia adquirida** (Gonzalez-Zorn et al., 2010; Vignoli y Seija, 2007). Estos mecanismos de resistencia pueden producirse en una bacteria determinada mediante mutación genética o mediante el intercambio de material genético por transferencia horizontal (fundamentalmente por conjugación, en menor medida por transformación o transducción) entre células bacterianas de especies relacionadas o diferentes (del Arco, 2014).
- Mecanismos bioquímicos. Las bacterias utilizan distintos mecanismos para hacerse resistentes a los antibióticos: dificultan el acceso del antibiótico a su diana, facilitan su transporte al exterior de la bacteria a través de bombas de expulsión activa, modifican la estructura molecular del antibiótico de forma que pierda su actividad antimicrobiana, modifican la diana para dificultar la unión del antibiótico o incrementan su producción de forma que las cantidades de antibiótico sean insuficientes para unirse a toda ella e incluso desarrollan vías metabólicas alternativas a la que inhibe el antimicrobiano (del Arco, 2014)

CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS (Jane, 1993).

1.- Por su efecto Antimicrobiano:

Los antibióticos no siempre consiguen lisa y/o matar a las bacterias, sino que en ocasiones solo impiden su crecimiento (Mandell, 1994). Esta capacidad de acción frente a las bacterias de los antibióticos como bactericidas, bacteriolíticos o bacteriostáticos, permitió clasificar a los antibióticos en dos grandes grupos:

- **BACTERICIDAS:** Son los antimicrobianos que provocan la lisis y muerte bacteriana y, por consiguiente, el proceso es irreversible
 - Aminoglucósidos
 - Beta-lactámicos (penicilinas y cefalosporinas)
 - Glucopéptidos (Vancomicina)
 - Polimixinas
 - Quinolonas (Norfloxacino, Ácido nalidíxico, etc.)
 - Vancomicina

- **BACTERIOSTATICOS:** Son los antimicrobianos que inhiben el crecimiento y multiplicación bacteriana. Bloquean el desarrollo y la multiplicación de las bacterias, pero no las lisan, por lo que, al retirar el antibiótico, su efecto es reversible
 - Clindamicina
 - Cloranfenicol
 - Macrólidos (eritromicina)
 - Sulfamidas
 - Tetraciclinas

Por tanto, los bacteriostáticos necesitarán la participación inmunitaria del huésped para erradicar la infección, lo que no será necesario en el caso de los bactericidas, que serán de elección en caso de enfermos inmunodeprimidos o infecciones graves (Olaechea Astigarraga, 2007).

2.- Por su espectro de actividad:

- Amplio espectro: Pueden actuar sobre bacterias, hongos o protozoos. Interfieren en el crecimiento de más de uno de ellos o de numerosas especies bacterianas. Comprenden tetraciclinas, el cloranfenicol y algunos β -lactámicos.
- Espectro menos amplio o intermedio: Actúan frente a un número más limitado de especies. Este grupo incluye la mayoría de los antimicrobianos, entre los que destacan los macrólidos y aminoglucósidos.
- Espectro reducido: Sólo tienen un comportamiento eficaz frente a un número limitado de especies, como son los glucopéptidos.

3.- Por su estructura química. Se agrupan en familias con propiedades generales similares:

- Betalactámicos.
- Tetraciclinas.
- Quinolonas.
- Aminoglucósidos.
- Glucopéptidos.
- Macrólidos.
- etc.

4.- Por su mecanismo de acción:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- Alteración de la función de la membrana celular.
- Inhibición de la síntesis de proteínas.
- Inhibición de la síntesis o función de los ácidos nucleicos (García et al., 1999)

MECANISMO DE ACCION

Se agrupan en función a su blanco de acción. Pueden actuar sobre la síntesis de la membrana o pared bacteriana, sobre el ADN (replicación), sobre la transcripción, sobre la biosíntesis de proteínas o sobre el metabolismo. (Martínez y Sánchez, 2007)

1.- INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR:

- B-lactámicos: Penicilinas, Cefalosporinas.
- Bacitracin.
- Ristocetina.
- Vancomicina.

Tanto las células de los mamíferos como las bacterias tienen membranas celulares necesarias para su integridad funcional, pero las bacterias tienen además de la membrana celular una pared celular externa rígida de la que carecen las células de los mamíferos. La lesión de la pared celular o la inhibición de su formación pueden conducir a la lisis de la célula.

El anillo B-lactámico de la Penicilina hace que la pared celular pierda su acción de contenedor lo que permite la lisis de la bacteria. En bacterias Grampositivas, la pared es accesible, por el contrario, en bacterias Gramnegativas la pared se encuentra entre dos membranas y no hay tal accesibilidad, por lo que ha sido necesario producir por síntesis química nuevos preparados capaces de ejercer su acción.

2.- ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LA MEMBRANA CELULAR:

- Polimixinas y quimioterápicos antifúngicos.

La membrana celular es una barrera selectiva que mantiene la composición interna de la célula. Si la integridad funcional de la membrana se altera, los iones y macromoléculas se escapan y la célula se lesiona y muere.

3.- INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEINAS:

- Aminoglucósidos.
- Tetraciclinas.

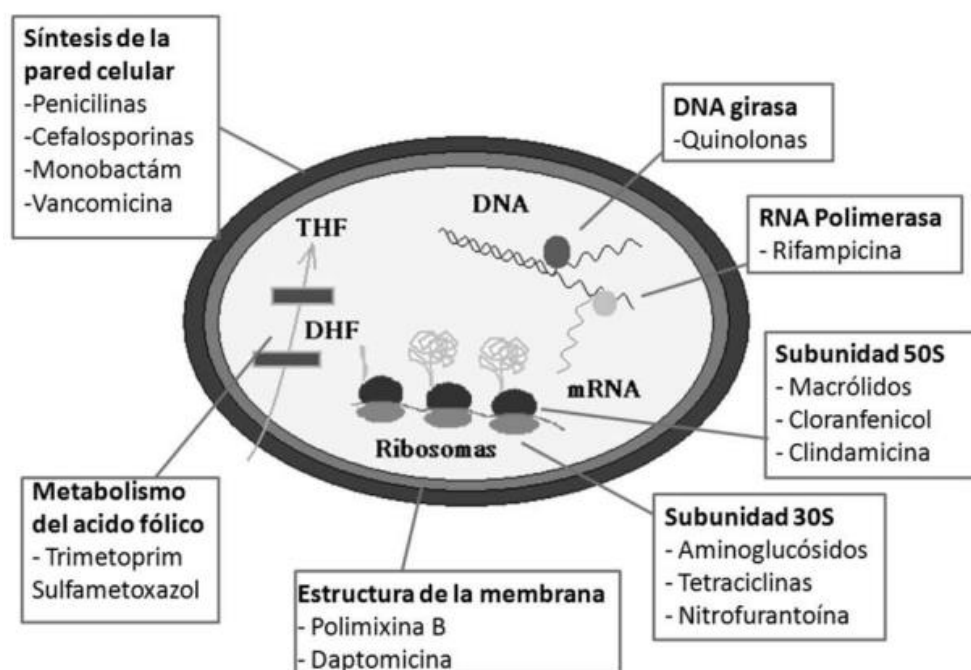
- Cloranfenicol.
- Macrólidos.
- Lincosamidas.

La síntesis de las proteínas tiene lugar gracias a la traducción de la información genética codificada en el ARNm. Los ribosomas o unidades funcionales de la síntesis proteica de las bacterias y de los mamíferos no se dividen en las mismas subunidades, diferencia que explica por qué los fármacos antimicrobianos inhiben los ribosomas bacterianos sin tener efectos en las células de los mamíferos. En general, los antimicrobianos que inhiben la síntesis proteica tienen efecto bacteriostático, excepto los aminoglucósidos que son bactericidas.

4.- INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS O FUNCIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEÍCOS:

De tres formas:

- 1.- Interfiriendo la replicación del ADN. (Quinolonas).
- 2.- Impidiendo la transcripción. (Rifampicina, Actinomicina).
- 3.- Inhibiendo la síntesis de los metabolitos esenciales. (Sulfamidas, Timetropin, Pirimetamina, Metrotrexato) (Martínez y Sánchez, 2007).



Sitios de acción de los antibióticos (Tafur et al, 2008).

Biocidas

El otro gran grupo de antimicrobianos son los biocidas. Los biocidas son toda sustancia o mezcla, compuesta por una o más sustancias activas, que tienen la finalidad de destruir, contrarrestar o neutralizar cualquier organismo nocivo, o de impedir su acción o ejercer sobre él un efecto de control de otro tipo, por cualquier medio que no sea una mera acción física o mecánica. Son seguros para aplicarlos en tejidos vivos, sin embargo, los **desinfectantes**, aunque son similares, están destinados a usarse en superficies u objetos inanimados. Suelen utilizarse en laboratorios, hospitales y centros de salud en los procesos de control y desinfección (Cabrera et al., 2007).

Existen 22 tipos diferentes de biocidas que, por regla general, se clasifican en cuatro grandes grupos según el Reglamento (UE) 528/2012: los desinfectantes y biocidas generales, los conservantes, los plaguicidas y otros biocidas.

- **Grupo principal 1: Desinfectantes**

Estos tipos de biocidas excluyen los biocidas de limpieza que no persiguen un efecto biocida, incluidos los detergentes líquidos y en polvo y productos similares.

<i>Tipo de producto</i>	<i>Descripción</i>
<i>TP 1 Higiene humana</i>	Biocidas empleados con fines de higiene humana aplicados sobre la piel o el cuero cabelludo o en contacto con ellos con la principal finalidad de desinfectar la piel o el cuero cabelludo.
<i>TP 2. Desinfectantes y plaguicidas no destinados a la aplicación directa a personas o animales</i>	Productos empleados para desinfección de superficies, materiales, equipos y muebles que no se utilizan en contacto directo con alimentos o piensos. Los ámbitos de utilización incluyen, las piscinas, acuarios, aguas de baño y otras; los sistemas de aire acondicionado y las paredes y suelos de lugares privados o públicos, zonas industriales y otras zonas destinadas a actividades profesionales.

		Productos utilizados para la desinfección del aire, el agua no destinada al consumo humano o animal, retretes químicos, aguas residuales, desechos de hospitales y tierra. Productos utilizados como alguicidas para el tratamiento de piscinas, acuarios y otras aguas y para el tratamiento reparador de materiales de construcción. Productos destinados a ser incorporados en textiles, tejidos, mascarillas, pinturas y otros artículos o materiales con el fin de obtener artículos tratados con propiedades desinfectantes.
<i>TP 3. Higiene veterinaria</i>		Productos empleados con fines de higiene veterinaria como desinfectantes, jabones desinfectantes, productos de higiene bucal o corporal o con funciones antimicrobianas. Productos utilizados para la desinfección de materiales y superficies relacionadas con el alojamiento o transporte de animales.
<i>TP 4. Alimentos y piensos</i>		Productos empleados en desinfección de equipos, recipientes, utensilios para consumo, superficies o tuberías relacionados con producción, transporte, almacenamiento o consumo de alimentos o piensos (incluida agua potable) para personas y animales. Productos empleados para impregnar materiales que puedan estar en contacto con alimentos.
<i>TP 5. Agua potable</i>		Productos empleados para la desinfección de materiales y superficies relacionados con el alojamiento o transporte de animales.

Grupo principal 2. Conservantes

Este tipo de productos solo abarca los destinados a prevenir el crecimiento de microorganismos y algas, salvo que se indique lo contrario.

<i>Tipo de producto</i>	<i>Descripción</i>
<i>TP. 6 Conservantes para productos durante almacenamiento</i>	Productos empleados para la conservación de productos manufacturados que no sean alimentos, piensos, productos cosméticos o medicinales, ni productos sanitarios, mediante

TP. 7 Conservantes para películas

el control del deterioro microbiano con el fin de prolongar su vida útil.

Productos empleados como conservas para el almacenamiento o utilización de cebos rodenticidas, insecticidas o de otro tipo.

Productos empleados para la conservación de películas o recubrimientos mediante el control del deterioro microbiano o del crecimiento de algas, con el fin de proteger las propiedades iniciales de la superficie de materiales u objetos como selladores, pinturas, plásticos, aglutinantes, adhesivos murales, papeles y obras de arte.

TP. 8 Protectores para maderas

Productos empleados para proteger la madera, desde la fase del aserradero incluida o los productos derivados de la madera, mediante el control de los organismos que destruyen o alteran la madera incluidos los insectos.

Se incluyen en este tipo de producto tanto los de carácter preventivo como los de carácter curativo.

TP. 9 Protectores fibras, cuero, caucho y materiales polimerizados

Productos empleados para la conservación de materiales fibrosos o polimerizados como productos textiles mediante el control del deterioro microbiano.

Este tipo de producto incluye los biocidas que impiden el depósito de microorganismos en la superficie de los materiales y por tanto inhiben o impiden la aparición de malos olores o presentan ventajas de otro tipo.

TP 10. Conservantes de materiales de construcción

Productos empleados para la conservación de materiales de albañilería, materiales compuestos u otros materiales de construcción distintos de la madera mediante el control de ataques microbianos y por algas

TP. 11 Protectores de líquidos utilizados en sistemas de refrigeración y procesos industriales

Productos empleados para la conservación del agua u otros líquidos utilizados en sistemas de refrigeración y en procesos industriales mediante el control de los organismos nocivos como microbios, algas y mejillones.

	No se incluyen en este tipo de producto los productos empleados para la desinfección del agua potable o del agua de piscina.
<i>TP. 12 Productos antimoho</i>	Productos empleados para la prevención o el control de la proliferación de mohos sobre los materiales, equipos y estructuras utilizados en procesos industriales, por ejemplo, la madera y pulpa de papel, estratos de arena porosa en la extracción de petróleo.
<i>TP. 13 Productores de líquidos empleados para trabajar o cortar materiales</i>	Productos para controlar el deterioro microbiano de los líquidos empleados para trabajar o cortar metales, cristales u otros materiales.

- **Grupo 13. Plaguicidas**

<i>Tipo de producto</i>	<i>Descripción</i>
<i>TP 14. Rodenticidas</i>	Productos empleados para el control de los ratones, ratas u otros roedores por medios distintos de la repulsión o la atracción.
<i>TP 15. Avicidas</i>	Productos empleados para el control de las aves por medios distintos de la repulsión o atracción.
<i>TP 16. Molusquicidas, vermicidas y productos para controlar otros invertebrados</i>	Productos empleados para el control de moluscos, gusanos e invertebrados no cubiertos por otros tipos de producto, por medios distintos de la repulsión o la tracción.
<i>TP 17. Piscicidas</i>	Productos empleados para el control de los peces, por medios distintos de la repulsión o atracción
<i>TP 18. Insecticidas, acaricidas y productos para controlar otros artrópodos</i>	Productos empleados para el control de artrópodos, como por ejemplo insectos, arácnidos y crustáceos, por medios distintos de la repulsión o la tracción.
<i>TP 19. Repelentes y atrayente</i>	Productos empleados para el control de los organismos nocivos (invertebrados como las

	pulgas; vertebrados como las aves, peces, o roedores), mediante repulsión o atracción, incluidos los que se utilizan para la higiene veterinaria o humana, ya sea directamente sobre la piel o indirectamente en el entorno de las personas o animales.
<i>TP 20. Control de otros animales vertebrados</i>	Productos empleados para el control de vertebrados distintos de los cubiertos por los demás tipos de producto de este grupo principal, por distintos medios de la repulsión y atracción.

- **Grupo principal 4. Otros biocidas**

<i>Tipo de producto</i>	<i>Descripción</i>
<i>TP 21. Productos antiincrustantes</i>	Productos empleados para el control de la fijación y crecimiento de organismos incrustantes (microorganismos o formas superiores de especies animales o vegetales) en barcos, equipos de acuicultura u otras estructuras acuáticas.
<i>TP 22. Líquidos para embalsamiento y taxidermia</i>	Productos empleados para la desinfección y conservación de cadáveres animales o humanos, o de partes de estos.

8. OBJETIVOS

- Aislamiento de bacterias resistentes a distintos antibióticos de uso habitual en el tratamiento de infecciones bacterianas, procedentes de distintos tipos de encurtidos.
- Aislamiento de bacterias resistentes a diferentes biocidas utilizados como desinfectantes y antisépticos en zonas como hospitales y laboratorios, procedentes de distintos tipos de alimentos encurtidos.
- Identificación de cepas bacterianas que sean resistentes a distintos antimicrobianos, presentes en muestras de alimentos encurtidos.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Preparación de las muestras

Los alimentos encurtidos empleados para el estudio fueron:

- Aceitunas deshuesadas
- Aceitunas negras
- Berenjenas
- Pepinillos

Estos alimentos fueron adquiridos en dos establecimientos diferentes. En primer lugar, para la preparación de las muestras, se pesaron 2`5 gramos de todos los alimentos para posteriormente juntar el mismo tipo de alimento haciendo un total de 5 gramos. Así, se consigue mezclar el alimento obtenidos de las dos grandes superficies en la misma proporción. Después se adicionaron 45 ml de solución salina previamente preparada en bolsitas esterilizadas. La mezcla se homogeneizó gracias al stomacher. De esta forma, las muestras quedan diluidas 1/10 (10^{-1}) y será la solución madre a partir de la que se empezará a trabajar.

A partir de estas diluciones madre, se realizaron las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} en distintos eppendorf con solución salina al 0,9% de cada una de las 5 muestras:

- Dilución 10^{-2} : 100 μ l de la dilución madre.
- Dilución 10^{-3} : 100 μ l de la dilución 10^{-2} .

El objetivo de hacer diluciones es poder llevar a cabo el recuento de las colonias en el medio Mueller – Hinton Agar (MH).

Las distintas diluciones se mantenían en cámara frigorífica.

9.2- Elaboración de los medios de cultivo

9.2.1. Medios sólidos

- Muelle-Hinton Agar (MH)

Composición Mueller – Hinton Agar

Fórmula* por litro de agua purificada
Extracto de carne bovina 2,0 g
Hidrolizado ácido de caseína 17,5
Almidón 1,5
Agar 17,0
pH 7,3 +/- 0,2

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Fueron preparados cuatro matraces de cultivo sólido MH con los distintos antibióticos con los que trabajamos. Los antibióticos fueron los siguientes: Ampicilina, Ceftazidina, Tetraciclina y Sulfato de estreptomicina.

MH + Ampicilina (32 µg/ml)

MH + Ceftazidina (16 µg/ml)

MH + Tetraciclina (16 µg/ml)

MH + Sulfato de estreptomicina (4 µg/ml)

La elaboración de estos medios de cultivo se realizó en matraces con capacidad de 1L, adicionándole 30,4 g de MH y 800 ml de agua destilada. Posteriormente, se autoclavaron durante 20 minutos a 120° C. Una vez terminado el tiempo de autoclavado, se dejaron atemperar los matraces a una temperatura de 55° C en el baño María y se adicionaron las cantidades correspondientes de antibiótico a cada uno de ellos. Se preparó, además, medio de cultivo MH sin antibióticos. Al igual que antes, se llevó a cabo el mismo proceso, 30,4 g de Agar en 800 ml de agua destilada con esterilización en el autoclave.

Finalmente, el medio fundido se repartió en placas Petri y se dejaron gelificar a temperatura ambiente.

9.2.2. Medios líquidos

- Solución salina (NaCl al 0,9%).

Se elaboraron tanto eppendorf con solución salina como matraces de 250 ml para poder diluir el alimento. Los matraces sirvieron para las bolsitas de la dilución madre, mientras que los eppendorf sirvieron para hacer las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} .

- Tryptic Soy Broth (TSB)

Composición del TSB

Fórmula** por litro de agua purificada	
Bacto Tryptone (digerido pancreático de caseína)	17,0 g
Bacto Soytone (digerido péptico de harina de soja)	3,0
Glucosa (dextrosa)	2,5
Cloruro sódico	5,0
Fosfato dipotásico de hidrógeno	2,5
pH	7,3 . 0,2

** Ajustada y/o enriquecida para satisfacer los criterios de rendimiento.

Se prepararon varios matraces con capacidad para 1L de TSB a una concentración de 30g/l.

El procedimiento fue pesar 4,5 g y añadir 150 ml de agua destilada. Se esterilizó en el autoclave a 120°C durante 20 minutos.

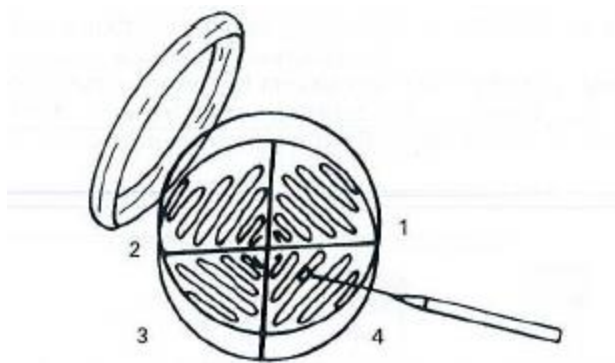
9.3. Metodología

9.3.1. Siembra en placa y aislamiento de colonias

Una vez tenemos las placas gelificadas de MH con los diferentes antibióticos se sembraron las diluciones 10^{-1} (dilución madre), 10^{-2} y 10^{-3} . Se realizó por duplicado, por lo que para cada dilución teníamos dos placas para cada alimento y cada antibiótico, es decir, un total de 96 placas.

El procedimiento fue sembrar 100 μ l de las diluciones con asa de Drigalski y dejarlas incubar durante al menos 24 horas a 37° C. Pasadas las 24 horas se observa si ha habido crecimiento o no.

Las placas en las que hubo crecimiento fueron aisladas posteriormente a otras que solo presentaban medio MH. Solo se aislaron 3 o 4 colonias crecidas de las placas en cuadrantes con asa de siembra. Todo ello siempre en condiciones de esterilización. De nuevo, una vez realizado el traspaso de las colonias a las nuevas placas se dejaron incubar a 37° C durante al menos 24 horas. Al trabajar en este caso con BAL, el tiempo de crecimiento fue algo más largo, por lo que hubo que dejarlas crecer alrededor de 36-48 horas.



9.3.2. Tinciones

Una vez transcurrido el tiempo de crecimiento de las colonias se realizaron tinciones sencillas para su identificación, empleando azul de metileno de las colonias aisladas. Posteriormente, las preparaciones se visualizaron al microscopio y según su morfología se identificaron como levaduras o bacterias.

En total, se seleccionaron 15 colonias entre los cuatro alimentos empleados para el ensayo.

9.3.3. Resistencia a antibióticos

Para comprobar la sensibilidad de las colonias seleccionadas en el ensayo se utilizó un antibiograma MH con discos de antibióticos. Las 15 cepas se sembraron en medio líquido TSB y se incubaron a 37° C durante 24 horas. Tras las 24 horas de incubación, las cepas fueron inoculadas en placas MH con un escobillón.

Una vez inoculadas, se colocaron discos de antibióticos sobre el medio MH. Fueron 11 antibióticos los que se emplearon, por lo que se emplearon 2 placas de MH. Los antibióticos empleados fueron los siguientes:

Placa 1		Placa 2	
Antibiótico	Concentración (mcg)	Antibiótico	Concentración (mcg)
Eritromicina (E)	30	Cefotaxima (CTX)	30
Tetraciclina (TE)	30	Ceftazidima (CAZ)	30
Cloranfenicol (C)	30	Cefoxitina (FOX)	30
Gentamicina (CN)	10	Meropenem (MEM)	10
Kanamicina (K)	30	Ciprofloxacino (CIP)	5
Sulfonamida (S3)	300		

Después de colocar los discos de antibióticos sobre el medio en la placa, se dejan incubar durante 24 horas a 37° C. Pasadas las 24 horas de incubación, se observa sobre la placa si existen halos de inhibición de cada uno de los antibióticos empleados.

9.3.4. Resistencia a biocidas

La resistencia a biocidas se realizó mediante la técnica de microtitulación. Se obtuvieron cultivos overnight en medio TSB de cada una de las cepas aisladas incubándolas a 37° C. Los biocidas que se utilizaron fueron los siguientes:

- Cloruro de benzalconio
- Cetrimida
- Hexadecilpiridinio
- Triclosán

- Hexaclorofeno
- Clorhexidina digluconato
- PHMG (Polyhexamethylene guanidine hydrochloride)

Se realizaron diluciones 1/10 de las cepas bacterianas aisladas en tubos eppendorf con 900 µl de solución salina.

Se prepararon las distintas diluciones de los biocidas y para ello, se utiliza medio nutritivo líquido estéril, TSB. En la dilución al 10% del hexaclorofeno y del triclosán se utiliza alcohol etílico de 96° para facilitar la disolución del compuesto. El esquema seguido para la obtención de las distintas concentraciones fue el siguiente:

	Concentración	Biocida	TSB
Ci	10%	1 ml o 1 g	9 ml
C1	1%	1 ml (de Ci)	9 ml
C2	0,25%	250 µl (de Ci)	9750 µl
C3	0,025%	25 µl (de Ci)	9975 µl
C4	0,0025%	25 µl (de C1)	9975 µl
C5	0,00025%	100 µl (de C3)	9900 µl

En los pocillos de las placas de microtitulación se pusieron:

- 180 µl de cada biocida (a la concentración indicada) + 20 µl de cada una de las cepas.
- Control positivo con 180 µl de TSB líquido estéril + 20 µl de cada una de las cepas.
- Control negativo con 180 µl de TSB líquido estéril.
- Control negativo con 180 µl de cada una de las concentraciones (C1-C5) de biocida a ensayar.

		Nº DE CEPAS (20 µl)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C1 (1%)		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C2 (0,25%)		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C3 (0,025%)		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C4 (0,0025%)		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C5 (0,00025%)		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C+ (control +)		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
(200 µl)		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		T	S	B				C1	C2	C3	C4	C5	

Se trabajó en condiciones de esterilidad y una vez completada cada placa de microtitulación, se incubaron a 37°C durante 24 horas.

El lector de placas utilizado para la lectura de los resultados a las 24 horas fue el lector de placas Sunrise de TECAN.

9.3.5. Extracción de ADN

Se realizó una extracción de ADN total de dos de las cepas seleccionadas que presentaban resistencia a ambos antimicrobianos (antibióticos y biocidas). La extracción se realizó siguiendo las instrucciones del kit de ensayo GenElute Bacterial Genomic Dna Kit de Sigma-Aldrich. Se midió la concentración en Nanodrop para comprobar la concentración y la pureza de las muestras.

Después se llevaría a cabo una PCR 16S. El contenido de la mix de la PCR fue el siguiente:

ADN total	2 µl
Buffer (10x)	5 µl
H₂O (mq estéril)	31 µl
dNTP's (200 pm)	6 µl
Taq Polimerasa (5U/µL)	0,25 µl
MgCl₂ (100 mM)	0,75 µl
Primer 16S (10 mM)	2,5 µl
Primer 23F (10 mM)	2,5 µl

10. RESULTADOS y DISCUSIÓN

Nomenclatura de alimentos y antibióticos

Para diferenciar las placas con los distintos alimentos que se cultivaron en MH con su respectivo antibiótico con el que se trabajó, se nombraron de la siguiente forma:

- Para los alimentos:
 - Aceitunas → ①
 - Aceitunas negras → ②
 - Berenjenas → ③
 - Pepinillos → ④

- Para MH + Antibiótico:
 - MH + Ampicilina 32 µg/ml → A
 - MH + Ceftazidina (16 µg/ml) → B
 - MH + Tetraciclina (16 µg/ml) → C
 - Medio E: MH + Sulfato de estreptomicina (4 µg/ml) → D

De esta forma, se identificaba el alimento que había sido cultivado en el medio con el antibiótico correspondiente.

Recuento de UFC

Pasadas 24 horas de incubación, se realizó un recuento del crecimiento bacteriano de cada una de las placas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes para las distintas concentraciones:

Aceitunas deshuesadas	MH + AMP		MH + CEF		MH + TET		MH + S. EST	
Dilución								
10⁻¹	65	67	+300	+300	58	40	+ 300	+ 300
10⁻²	5	1	+300	+300	10	12	235	210
10⁻³	x	x	44	50	x	x	49	40

Tabla 1. Recuento de colonias del cultivo de aceitunas deshuesadas a distintas diluciones en MH + AMP, MH + CEF, MH + TET y MH + S. EST.

Hubo crecimiento en casi todas las placas de aceitunas deshuesadas.

- En MH + AMP crecieron colonias tanto a concentración 10⁻¹ y 10⁻², pero sin embargo en la dilución 10⁻³, no se apreció que hubiese crecimiento.
- En MH + CEF, crecieron en todas las placas, llegando incluso a superar las 300 UFC en las primeras diluciones.
- En MH + TET, al igual que en Ampicilina, no se apreció crecimiento en la última de nuestras concentraciones.
- En MH + S. EST, hubo una masificación en cuanto al crecimiento llegando a ser incontables en la primera de las concentraciones.

Aceitunas negras	MH + AMP		MH + CEF		MH + TET		MH + S. EST	
Dilución								
10⁻¹	69	22	+300	+300	70	55	+300	+300
10⁻²	3	11	156	184	5	7	135	142
10⁻³	2	2	22	20	x	x	2	10

Tabla 2. Recuento de colonias del cultivo de aceitunas negras a distintas diluciones en MH + AMP, MH + CEF, MH + TET y MH + S. EST.

En los cultivos de aceitunas negras hubo crecimiento para todas las diluciones de los diferentes antibióticos. Por lo tanto, presentaban resistencia a Ampicilina, Ceftazidina, Tetraciclina y Sulfato de estreptomicina. Tan solo hubo dos placas, las del medio MH + TET a concentración 10^{-3} en las que no se apreció ninguna colonia. Los antibióticos en los que más crecimiento hubo fueron Ceftazidina y Sulfato de estreptomicina llegando incluso a superar las 300 UFC.

Berenjenas								
Dilución	MH + AMP		MH + CEF		MH + TET		MH + S. EST	
10^{-1}	x	x	4	5	x	x	2	x
10^{-2}	x	x	1	2	x	x	x	x
10^{-3}	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabla 3. Recuento de colonias del cultivo de berenjenas a distintas diluciones AMP, MH + CEF, MH + TET y MH + S. EST.

En cuanto a las berenjenas y, al contrario que en los dos casos anteriores, apenas hubo crecimiento en las placas. Tan solo hubo crecimiento de colonias en las placas que presentaban Ceftazidina y Sulfato de estreptomicina en las diluciones 10^{-1} o 10^{-2} .

Pepinillos								
Dilución	MH + AMP		MH + CEF		MH + TET		MH + S. EST	
10^{-1}	25	26	110	134	16	10	27	25

10⁻²	4	7	17	13	8	9	3	5
10⁻³	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabla 4. Recuento de colonias del cultivo de pepinillos a distintas diluciones en MH + AMP, MH + CEF, MH + TET y MH + S. EST.

En los cultivos de pepinillos, exceptuando las placas de 10⁻³, hubo crecimiento en todas, por lo que también crecieron colonias que presentaban resistencia a estos antibióticos.

	MH + AMP	MH + CEF	MH + TET	MH + S. EST
Aceitunas deshuesadas	6,1x10 ² ufc/ml	300 ufc/ml	4,9x10 ² ufc/ml	300 ufc/ml
Aceitunas negras	4,55x10 ² ufc/ml	300 ufc/ml	6,25x10 ² ufc/ml	300 ufc/ml
Berenjenas	x	4,5x10 ¹ ufc/ml	x	1x10 ¹ ufc/ml
Pepinillos	2,55x10 ² ufc/ml	122x10 ³ ufc/ml	1,3x10 ² ufc/ml	2,6x10 ² ufc/ml

Tabla 5. Media de las bacterias obtenidas en los cultivos MH + Antibióticos.

Identificación de bacterias

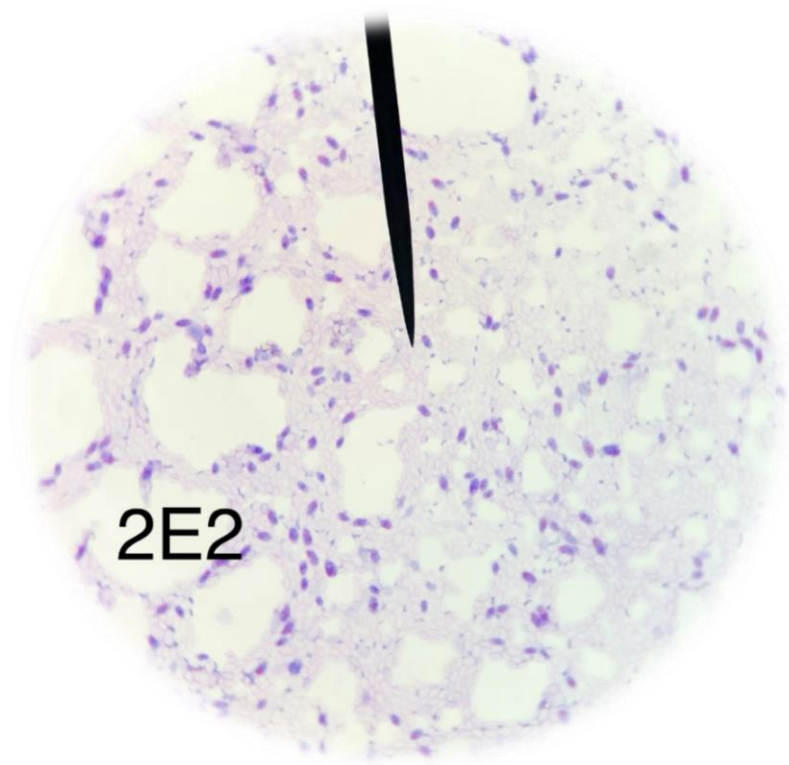
Una vez realizado el recuento, y tras aislar algunas de las colonias de las distintas diluciones (concretamente 4 para cada antibiótico), se hicieron tinciones sencillas para identificar si las colonias eran bacterias (bacilos o cocos) o levaduras. En el caso de ser levaduras, se desecharían las placas, quedándonos de este modo solo con bacterias.

Tras observarse al microscopio, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

		Alimento1	Alimento 2	Alimento 3	Alimento 4
Ampicilina	A1	Levaduras	Levaduras	X	Levaduras
	A2	Bacilos	Levaduras	X	Levaduras
	A3	Bacilos	Levaduras	X	Levaduras
	A4	Bacilos	Levaduras	X	Levaduras
Ceftazidina	B1	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Levaduras
	B2	Levaduras	Levaduras	Bacilos	Levaduras
	B3	Bacilos	Levaduras	Bacilos	Levaduras
	B4	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Levaduras
Tetraciclina	C1	Levaduras	Levaduras	X	Levaduras
	C2	Levaduras	Cocos	X	Levaduras
	C3	Levaduras	Levaduras	X	Levaduras
	C4	Levaduras	Levaduras	X	Levaduras
Sulf. Estreptomicina	D1	Levaduras	Levaduras	Levaduras	Levaduras
	D2	Bacilos	Levaduras	Levaduras	Levaduras
	D3	Levaduras	Levaduras	X	Levaduras
	D4	Bacilos	Levaduras	X	Levaduras

Tabla 6. Alimento 1: Aceitunas deshuesadas Alimento 2: Aceitunas negras Alimento 3: Berenjenas
Alimento 4: Pepinillos X: no hubo crecimiento en placa.

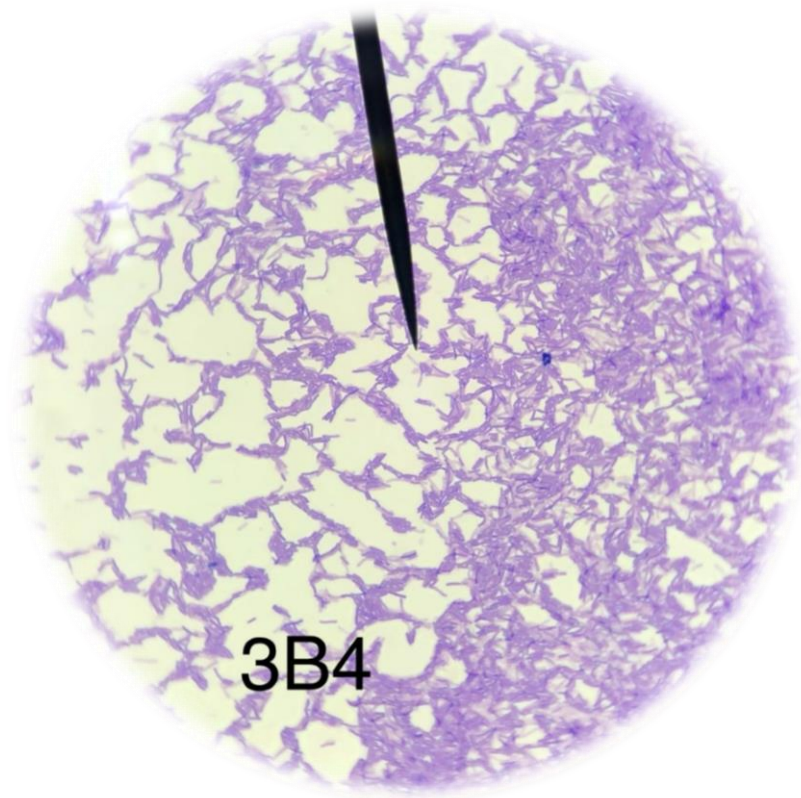
Una vez realizadas las tinciones e identificadas las colonias, se repitieron tres placas de nuevo, ya que, no se apreciaban del todo bien las colonias y aparentemente parecía que hubiese mezcla entre bacterias y levaduras. Concretamente, las placas fueron 1E3, 2A1 y 2D2.



Microfotografía del cultivo bacteriano de aceitunas negras en MH + S. EST

Tras su repetición, se descartaron definitivamente ya que el crecimiento en esas placas era de levaduras. Las levaduras causan contaminación en un gran número de alimentos, aunque su papel como agentes contaminantes es comúnmente descuidado y subestimado (Deak, 1995).

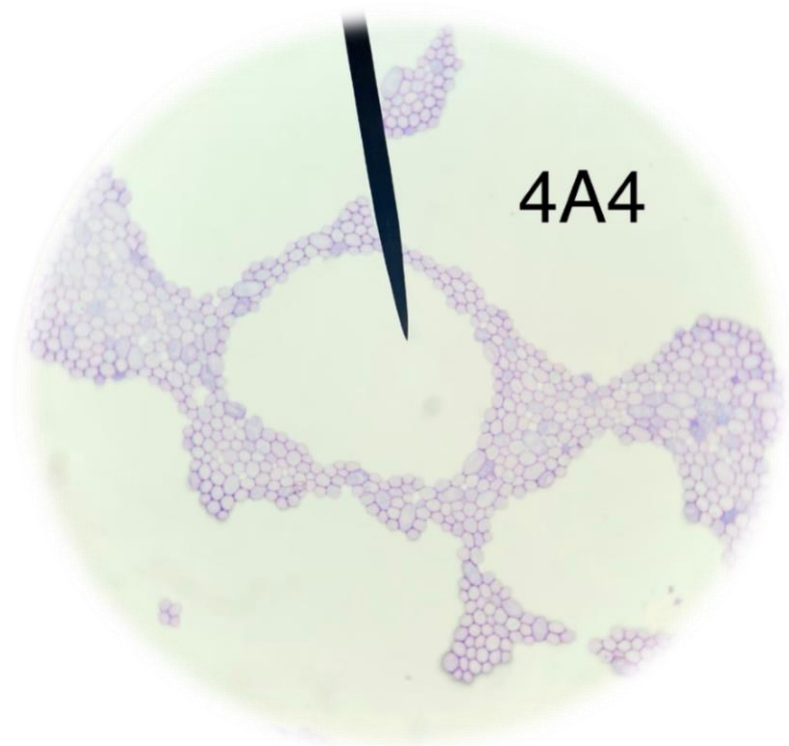
Por lo tanto, una vez realizado el recuento de bacterias y visualizado mediante tinciones sencillas, las colonias con las que continuamos el ensayo fueron las siguientes: 1A2, 1A3, 1A4, 1B1, 1B3, 1B4, 1D2, 1D4, 2B1, 2B4, 2C2, 3B1, 3B2, 3B3 y 3B4.



Microfotografía del cultivo bacteriano de berenjenas en MH + Ceftazidine.



Microfotografía del cultivo bacteriano de aceitunas negras en MH + Ceftazidine.



Microfotografía de algunas levaduras presentes en pepinillos en el medio MH + Ampicilina.

Todas las colonias identificadas como bacterias (bacilos o cocos), fueron cultivadas en medio MH. Al medio se le añadieron 11 antibióticos para comprobar si presentaban resistencia a estos antibióticos.

Recuento resistencia a antibióticos.

Los límites establecidos para comprobar si existe resistencia o no a las distintas cepas presentes en el ensayo fueron las siguientes (Adaptada de Patel et al., 2017):

	Concentración (mcg)	Sensible	Intermedia	Resistente
CIP	5	≥ 21 mm	16-20 mm	≤ 15 mm
CAZ	30	≥ 21 mm	18-20 mm	≤ 17 mm
FOX	30	≥ 18 mm	15-17 mm	≤ 14 mm
CTX	30	≥ 26 mm	23-25 mm	≤ 22 mm
MEM	10	≥ 23 mm	20-22 mm	≤ 19 mm

C	30	≥ 18 mm	13-17 mm	≤ 12 mm
TE	30	≥ 15 mm	12-14 mm	≤ 11 mm
K	30	≥ 18 mm	14-17 mm	≤ 13 mm
CN	10	≥ 15 mm	13-14 mm	≤ 12 mm
S3	300	≥ 17 mm	13-16 mm	≤ 12 mm
E	30	≥ 23 mm	14-22 mm	≤ 13 mm

Tabla 7. Límites de resistencia y sensibilidad contra antibióticos. CIP: Ciprofloxacino; CAZ: Ceftazidima; FOX: Cefoxitina; CTX: Cefotaxima; MEM: Meropenem; C: Cloranfenicol; TE: Tetraciclina; K: Kanamicina; CN: Gentamicina; S3: Sulfonamida; E: Eritromicina.

Los resultados obtenidos una vez medidos los halos de inhibición fueron:

Cepa	CIP	CAZ	MEM	FOX	CTX	CN	TE	C	E	K	S3
1A2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1A3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1A4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1B1	25	20	23	0	23	+30	+30	+30	+30	+30	+30
1B3	30	24	25	0	30	+30	+30	+30	+30	+30	+30
1B4	27	24	20	0	23	+30	+30	+30	+30	+30	+30
1D2	30	20	25	0	30	+30	+30	+30	+30	+30	+30
1D4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
2B1	+30	+30	+30	+30	+30	+30	+30	+30	+30	+30	+30
2B4	25	20	30	9	30	+30	+30	+30	+30	+30	+30
2C2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
3B1	29	0	34	25	10	23	27	19	30	25	31
3B2	29	0	33	28	9	23	33	21	26	27	32
3B3	31	0	32	24	11	24	26	20	29	24	28

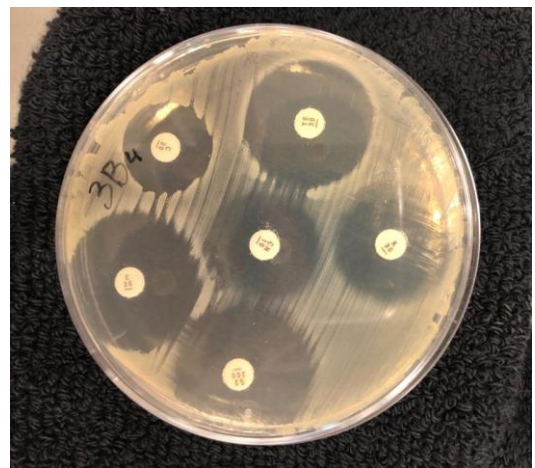
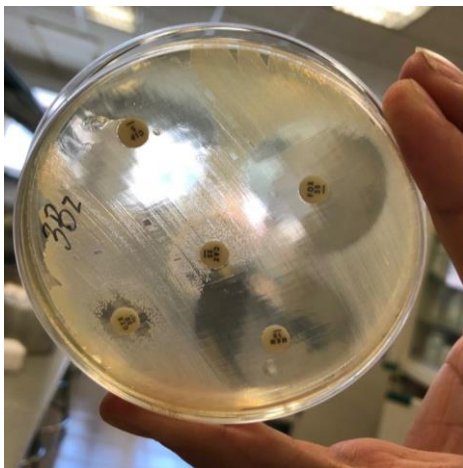
3B4	31	0	33	24	12	21	26	19	25	23	28
------------	----	----------	----	----	-----------	----	----	----	----	----	----

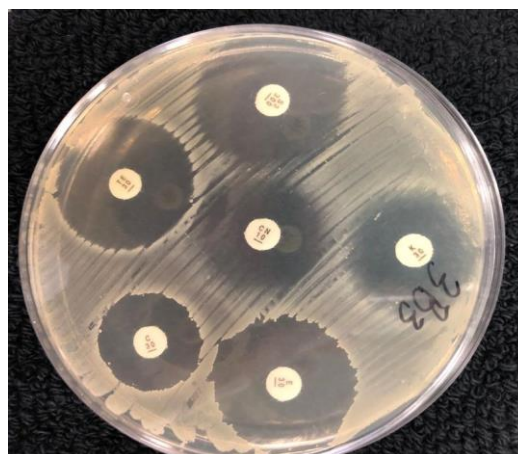
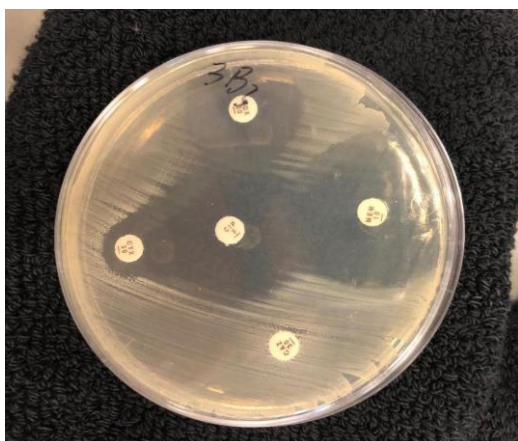
Tabla 8. Medidas en milímetros (mm) de los halos de inhibición de las cepas cultivadas con los distintos antibióticos.

Una vez medidos los halos, descartamos las cepas 1A2, 1A2, 1A4, 1D4 y 2C2 puesto que no presentaban ningún halo de inhibición en ninguno de los antibióticos presentes en el medio.

Tras estos resultados, podemos confirmar que:

- Las cepas 1B1, 1B3, 1B4, presentes en aceitunas deshuesadas, y 2B4 procedente de las aceitunas negras, son resistentes tanto a Ceftazidime como a Cefoxitina.
- La cepa 1D2 presente en las aceitunas deshuesadas era resistente a Cefoxitina y a Sulfato de Estreptomicina.
- Las cepas 3B1, 3B2, 3B3 y 3B4, presentes en las berenjenas, son resistentes para los antibióticos Ceftazidime, Ceftazidima y Cefotaxima





Imágenes de algunas de las placas con los discos de antibióticos. En ellas se pueden apreciar los distintos tamaños de los halos de inhibición según los antibióticos.

Resistencia a biocidas

Después de medir la absorbancia de todos los pocillos de la placa y tras restar los valores control según las concentraciones, los que presentaban una absorbancia mayor a 0.5 nm se consideraron positivos, es decir, resistentes al biocida. En general, a mayor concentración de los biocidas utilizados, menos era la absorbancia.

En las siguientes tablas se muestran los resultados según si hay o no, resistencia a los biocidas.

CB	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,0025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,00025	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
C+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 9. CB: Cloruro de benzalconio, 1: 1B1, 2: 1B3, 3: 1B4, 4: 1D2, 5: 2B1, 6: 2B4, 7: 3B1, 8: 3B2, 9: 3B3 y 10: 3B4.

CH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,0025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,00025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 10. CH: Clorhexidina digluconato, 1: 1B1, 2: 1B3, 3: 1B4, 4: 1D2, 5: 2B1, 6: 2B4, 7: 3B1, 8: 3B2, 9: 3B3 y 10: 3B4.

CT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,0025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,00025	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
C+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 11. CT: Ceftriaxona, 1: 1B1, 2: 1B3, 3: 1B4, 4: 1D2, 5: 2B1, 6: 2B4, 7: 3B1, 8: 3B2, 9: 3B3 y 10: 3B4.

HC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,0025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,00025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 12. HC: Hexaclorofeno, 1: 1B1, 2: 1B3, 3: 1B4, 4: 1D2, 5: 2B1, 6: 2B4, 7: 3B1, 8: 3B2, 9: 3B3 y 10: 3B4.

HP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,0025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,00025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 13. HP: Hexadecilpiridinio, 1: 1B1, 2: 1B3, 3: 1B4, 4: 1D2, 5: 2B1, 6: 2B4, 7: 3B1, 8: 3B2, 9: 3B3 y 10: 3B4.

T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,0025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,00025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 14. T: Triclosan, 1: 1B1, 2: 1B3, 3: 1B4, 4: 1D2, 5: 2B1, 6: 2B4, 7: 3B1, 8: 3B2, 9: 3B3 y 10: 3B4.

PHMG	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,0025	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
0,00025	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 15. PHMG: Polyhexamethylene guanidine hydrochloride, 1: 1B1, 2: 1B3, 3: 1B4, 4: 1D2, 5: 2B1, 6: 2B4, 7: 3B1, 8: 3B2, 9: 3B3 y 10: 3B4.

Extracción de ADN total e identificación del microorganismo

Una vez obtenidos los resultados en cuanto a resistencia de biocidas y antibióticos se realizó una extracción del ADN de dos de las cepas que presentaban resistencia a ambos antimicrobianos. En concreto, se usaron las cepas 3B2 y 1D2 para secuenciarse e identificar la bacteria.

- 1D2: Perteneciente a las aceitunas deshuesadas con resistencia a Sulfato de estreptomicina y Cefoxitina por parte de los antibióticos y resistencia Clorhexidina digluconato Hexaclorofeno y Hexadecilpiridinio por parte de los biocidas a concentración 0,00025.
- 3B2: Perteneciente a las berenjenas con resistencia a Ceftazidime, Ceftazidima y Cefotaxima por parte de los antibióticos y resistencia Cloruro de benzalconio, Clorhexidina digluconato, Hexaclorofeno, Cetrimida, Hexadecilpiridinio y Polyhexamethylene guanidine hydrochloride por parte de los biocidas a concentración 0,00025 e incluso alguno a 0,0025.

SAMPLE ID	NUCLEIC ACID CONC.	UNIT	A260	A280	PUREZA
3B2	77,5	ng/μl	1,55	0,894	1,73
1D2	48,6	ng/μl	0,972	0,628	1,55

Tabla 16. Concentración de ácido nucleicos y pureza de las cepas 1E2 y 3B2

	Max score	Total score	Query cover	Ident	
1D2	1740	1740	98%	96%	Lactobacillus paracasei subsp. tolerans strain NBRC 15906 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
3B2	1851	1851	100%	99%	Bacillus wiedmannii strain FSL W8-0169 16S ribosomal RNA, partial sequence

Tabla 17. Identificación de las cepas

11. CONCLUSIONES

- De los cuatro alimentos seleccionados, hubo crecimiento bacteriano en todos (dependiendo de las concentraciones); sin embargo, en los pepinillos, solo se identificaron levaduras.
- En cuanto a la resistencia de antibióticos, 5 de las primeras cepas preseleccionadas, tuvieron que ser descartadas por una mala visualización al microscopio. Desde el inicio, se tomaron como muestras bacterianas y posteriormente se confirmó que eran levaduras tras realizar una repetición del cultivo. El empleo de un antifúngico al inicio del ensayo habría facilitado la búsqueda de colonias bacterianas.
- De las diez cepas seleccionadas para aplicar los discos de antibióticos, ninguno presentaba resistencia a Ampicilina o Tetraciclina, puesto que las cepas que habíamos seleccionado con resistencia de estas placas resultaron ser levaduras y se descartaron.
- De los once discos de antibióticos utilizados, las cepas seleccionadas, presentaron resistencia solo a Cefoxitina, Cefotaxima y Ceftazidima.
- Solo una de las cepas, concretamente la cepa 3B2, presentaba resistencia casi todos los biocidas utilizados. Del total de las cepas, ninguna presentaba resistencia a partir de la [0.025], por lo que podemos deducir que a concentraciones elevadas imposibilita el crecimiento bacteriano.
- *Bacillus wiedmannii*, aislada inicialmente en MH procedente de las berenjenas encurtidas, presenta resistencia a bajas concentraciones de los biocidas: Cloruro de benzalconio, Clorhexidina digluconato, Cetrimida, Hexaclorofeno, Hexadecilpiridinio y Polyhexamethylene guanidine hydrochloride. Además, también presenta resistencia a los antibióticos Ceftazidina, Ceftazidima y Cefotaxima

- *Lactobacillus paracasei*, aislada inicialmente en MH procedente de las aceitunas deshuesadas, presenta resistencia a bajas concentraciones de los biocidas: Clorhexidina digluconato, Hexaclorofeno y Hexadecilpiridinio. Además, también presenta resistencia a los antibióticos Cefoxitina y al Sulfato de Estreptomicina.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Astiasarán, I., Martínez, A., 2000. Alimentos: Composición y propiedades. McGraw-Hill, D. L., Madrid.
2. Axelsson, L. T. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd rev. and exp. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-66.
3. Barboza, J., Vázquez, H., Salcedo, R., Bautista, M., 2004. Probióticos y conservadores naturales en alimentos. *Acta Universitaria*. 14: 32-38.
4. Bobillo, M., Marshall, V.M. 1991. Effect of salt and culture aeration on lactate and acetate production by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiology*, 8: 153-160.
5. Cabrera, C. E.; Gómez, R. F., Zúñiga, A. E. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*. 38(2): 149-158.
6. Carr, F., Chill, D., Maida, N., 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28: 281- 370.
7. Casp, V. A., Requena, J. A. 1999. Procesos de conservación de alimentos. Colección de Tecnología de Alimentos. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. pp. 97-98.
8. Cordiés Jackson L, Machado Reyes A, Hamilton Cordiés ML. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica*. 1998. [acceso 8 de junio de 2017]; 8(1): 13-27.

9. Davidson, B. E., Llanos, R. M., Cancilla, M. R., Redman, N. C., Hillier, A. J., 1995. Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *Int. Dairy Journal*. 5: 763-784.
10. Deak, T., Beuchat, L. R. 1993. Comparison of conductimetric and traditional plating techniques for detecting yeasts in fruit juices. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 546-550.
11. del Arco J. 2014. Antibióticos: situación actual. *Farmacia Profesional*. 28: 29-33.
12. Fernández, E. E. 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos. 1a ed. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México. pp. 43-60.
13. Fernández, M. J., García, P., Garrido, A., Duran, M. C., 1993. Microflora of the aerobic preservation of directly brined green olives from Hojiblanca cultivar. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 226-233.
14. Fleming, H. P., 1984. Developments in cucumber fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 34: 241-252.
15. Fleming, H. P., 1991. Mixed cultures in vegetable fermentations. In: *Mixed Cultures in biotechnology* (ed.), pp. 69-103. McGraw-Hill, New York.
16. Fuller, R., 1989. Probiotica in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 356-378.
17. García J. E., López R., Prieto J., 1999. Antimicrobianos en Medicina. *Sociedad Española de Quimioterapia*. Prous Science. Barcelona España.; 193-204.

18. Gilliland, S., 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 87: 175-188.
19. González, F., 1963. Microorganismos que se desarrollan en el aderezo de aceitunas verdes estilo español. Microbiol. España. 16: 221-230.
20. Gonzalez-Zorn, B., Cordero, R., San Millan, A., 2010. Resistencia a antibióticos en bacterias humanas y animales. Unidad de Información Científica y Divulgación de la Investigación. Universidad Complutense.
21. Hansen, E. B., 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. Int. J. Food Microbiol. 78: 119-131.
22. Harris, L. J., 1998. The microbiology of vegetable fermentations. In: Wood, B.J.B. (ed.). Microbiology of Fermented foods.
23. Hiriano, S. Upper, C., 2000. Bacterial in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vo 64 No. 3: 624-653.
24. Holzapfel, W. H., 2002. Appropriate starter culture technologies for small scale fermentation in developing countries. Int. J. Food Microbiol. 75: 197-212.
25. Jane, F., 1993. Antibióticos y quimioterápicos. Generalidades. En: Velazquez Farmacología. 16ª ed. Velasco A, Lorenzo P, Serrano JS, Andrés.Trelles F. (Eds) McGraw-Hill. Interamericana de España. Madrid; pp: 918-941.
26. Jay, J. M., 2000. Microbiología moderna de los alimentos. 4a ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 19-27, 106-108, 441-475.

27. Jay, J. M., 1992. Modern Food Microbiology. 4^a Edición. Chapman y Hall. Nueva York.
28. Jones, I. D., 1997. Some pigment changes in cucumbers during brining and brine storage. Food Technol. 3: 324.
29. Leveau, J. Y., Bouix, M., 2000. Microbiología industrial: Los microorganismos de interés industrial. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 167-187, 206, 227-242.
30. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., 2004. Brock. Biología de los Microorganismos. 10a ed. Ed. Prentice Hall. Madrid, España. pp. 122, 352, 400-402, 991.
31. Mandell G. L., 1994. Introducción a las enfermedades microbianas. En: Wyngaarden JB, Smith LIH, Bennet JC ed. Cecil. Tratado de Medicina Interna, 19a ed. México DF: Interamericana-Mc Graw- -Hill. Vol 2, part 20, cap 282: 1823-4.
32. Martínez, J., 1988. Fabricación de encurtidos de pepinillo. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 7. Madrid.
33. Martínez J.A, Sánchez F., 2007. Mecanismo de acción de los antibióticos. Jano n.º 1.660: 28-34.
34. Montañó, A., Sánchez, A. H., Casado, F. J., de Castro, A., Rejano, L., 2003. Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. Food Chemistry, 82: 297-302.
35. Nout, MJR, Rombouts, FM., 1992. Conservación fermentativa de alimentos vegetales. Diario de Bacteriología Aplicada, 73: 136s-147s.

36. Ogueke, C. C., Owuamanam, C. I., Ihediohanma, N.C., Iwouno, J.O., 2010. Probiotics and prebiotics. Unfolding Prospects for Better Human Health. *Pakistan Journal of Nutrition*. 9: 833-843.
37. Olachea Astigarraga PM., Garnacho Montero J., Grau Cerrato S., Rodríguez Colomo O., 2007. Recomendaciones para el tratamiento antibiótico de infecciones por cocos grampositivos en el paciente crítico. *Enferm. Infecc. Microb. Clin.*; 25: 446-466.
38. Organización Mundial de la Salud (OMS), 2015. Resistencia a los antibióticos.
39. Özay, G., Borcakli, M., 1995. Effect of brine replacement and salt concentration on the fermentation of naturally black olives. *Food Research International*, 28: 553-559.
40. Panagou, E. Z., Tassou C. C., 2006. Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of cv. Conservolea green olives. *Food Microbiology*, 23: 738-746.
41. Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., 1999. Microbiología. 4 ed., Ed. McGraw-Hill Interamericana. Zaragoza, España. pp. 515-518.
42. Ramírez, J., Rosas, P., Velázquez, M., Ulloa, J., Romero, F., 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 7.
43. Reglamento (UE) nº 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo de 2012 relativo a la comercialización y usos de los biocidas.

44. Rozano, V., Quiróz, C., Acosta, J., Pimentel, L., Quiñones, E., 2004. Hortalizas, las llaves de la energía. Revista Digital Universitaria. 5: 1-30
45. Sarmiento, A., & Herrera, J., 2003. Obtención y caracterización de un banco de levaduras con potencial aplicación probiótica. Trabajo de grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogota. P, 103.
46. Senses-Ergul S., Agoston R., Belák A. Deák T., 2005. Characterization of some yeast isolated from foods by traditional and molecular tests. International Journal Of Food Microbiology. Article in Press.
47. Tafur, J., 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en Bacterias Gram Negativas: Artículo de Revisión. Infectio. Asociación de infectología, 12(3).
48. Tassou, C.C., Panagou, E. Z., Katsaboxakis, K. Z., 2002. Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines.
49. Thomas, T., and J. Holly Berry., 1999. Pickling Fruits and Vegetables. Food Preservation Home Study Series. Cooperative extention. College of Agriculture and Home Economics, Washington State University, Pullman, WA. pp. 1-7.
50. Vaughn, R.H., 1982. Fermentation of olives. Industrial Microbiology, 4th edn. In: Reed, G. (ed.), pp. 206-236. AVI Publishing Co., Westport.
51. Vázquez, S.M., Suárez, H., Zapata, S., 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido-lácticas en la conservación de la carne. Revista chilena de Nutrición. 36: 64-71.

52. Vignoli, R., Seija, V., 2007. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Rev Principles and Practice of Infectious Diseases*. 352: 380-91.
53. Villamil Y., Zapata Y., 1999. Caracterización de levaduras fermentadoras aisladas de frutas en descomposición con potencial aplicación productora de etanol. Trabajo de Grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
54. Wood, B. J. B., Holzapfel, W. H., 1995. The genera of lactic acid bacteria. 1a ed. Ed. Blackie Academic & professional vol. 2. pp:1-12: 320-324.