

	UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS					   	
	CARTA DE AUTORIZACIÓN						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-06	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	1 de 1

Neiva, 23 de febrero de 2021

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Neiva

El (Los) suscrito(s):

Karen Julieth Jimenez Espinosa, con C.C. No 1075310724,

Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado Evaluación de la actividad antibacteriana de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y poder inhibitorio de extractos de hojas de Moringa deshidratadas frente a la cepa de referencia (*Staphylococcus Aureus* ATCC BAA-977) presentado y aprobado en el año 2021 como requisito para optar al título de Ingeniera Agrícola;

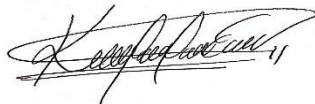
Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales "open access" y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma:



Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.

	UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS					   	
	DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	1 de 3

EdTÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Evaluación de la actividad antibacteriana de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y poder inhibitorio de extractos de hojas de Moringa deshidratadas frente a la cepa de referencia (*Staphylococcus Aureus* ATCC BAA-977)

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Jimenez Espinosa	Karen Julieth

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Amorocho Cruz	Claudia Milena
Collazos Escobar	Gentil Andres

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Ingeniera Agrícola

FACULTAD: Ingeniería

PROGRAMA O POSGRADO: Agrícola

CIUDAD: Neiva

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2021

NÚMERO DE PÁGINAS: 24

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas___ Fotografías_x___ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general___ Grabados___
Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___ Tablas
o Cuadros_x___

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento: PDF

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.

	UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS					   	
	DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	2 de 3

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. inhibición	inhibition	6. _____	_____
2. Patógeno	pathogen	7. _____	_____
3. Probiótico	probiotic	8. _____	_____
4. Antibiograma	antibiogram	9. _____	_____
5. Alimentos funcionales	functional food	10. _____	_____

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

La resistencia a los antibióticos para combatir patógenos que afectan al ser humano constantemente va en aumento, lo que hace necesario la búsqueda de alternativas naturales para combatirlos. En la lista de patógenos con prioridad elevada desarrollada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se encuentra *Staphylococcus aureus*; el cual puede llegar a causar infecciones que van desde las más leves hasta mortales. Este estudio contiene los resultados de la evaluación bajo condiciones *in vitro* de la actividad antibacteriana de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) obtenidas del quesillo Huilense, la fermentación de café, la leche materna y de extractos de hojas de *M. Oleífera* frente al patógeno de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977 realizando métodos de difusión por pocillos y discos para obtener el porcentaje de inhibición. Adicionalmente, las cepas BAL mencionadas se evaluaron mediante antibiogramas empleando Penicilina G, Ceftriaxona y Ciprofloxacino. En relación a los resultados de la evaluación antibacteriana de los extractos de *M. Oleífera*, se evidenció que los tres extractos no tuvieron efecto inhibitorio frente a *S. aureus* ATCC BAA-977 en ninguna de las concentraciones evaluadas. Por el contrario, las BAL presentaron poder antimicrobiano frente a esta cepa patógena, destacándose las cepas BAL aisladas de la fermentación del café (L) con un 43,7 % de inhibición. Las BAL fueron sensibles ante los antibióticos evaluados, mostrando que en caso de utilizarse como probiótico podrían emplearse como una alternativa a la terapia antibiótica para tratar *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

Resistance to antibiotics to combat pathogens that affect humans is constantly increasing, which makes it necessary to search for natural alternatives to combat them. In the list of high priority pathogens developed by the World Health Organization (WHO), there is *Staphylococcus aureus*, which can cause infections ranging from the mildest to deadly. This study contains the results of the *in vitro* evaluation of the antibacterial activity of Lactic Acid Bacteria (LAB) obtained from Huilense quesillo, coffee fermentation, breast milk and leaf extracts of *M. Oleífera* against the reference pathogen *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977 performing diffusion methods by wells and discs to obtain the percentage of inhibition. In addition, the LAB strains

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	3 de 3
--------	--------------	---------	---	----------	------	--------	--------

mentioned were evaluated using antibiograms using Penicillin G, Ceftriaxone and Ciprofloxacin. Regarding the results of the antibacterial evaluation of *M. Oleifera* extracts, they showed that the three extracts had no inhibitory effect against *S. aureus* ATCC BAA-977 in any of the concentrations evaluated. On the contrary, the LAB showed antimicrobial power against this pathogenic strain, highlighting the LAB strains isolated from the fermentation of coffee (L) with 43.7% inhibition. BAL were sensitive to the antibiotics evaluated, showing that if used as a probiotic they could be used as an alternative to antibiotic therapy to treat *Staphylococcus aureus*.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: Eduardo Pastrana Bonilla

Firma:

Nombre Jurado: Yeimis Yoana Montealegre Figueroa

Firma:

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) Y PODER INHIBITORIO DE EXTRACTOS DE HOJAS DE MORINGA DESHIDRATADAS FRENTE A LA CEPA DE REFERENCIA (*Staphylococcus Aureus* ATCC BAA-977)

Jimenez-Espinosa, K. J ¹, Collazos-Escobar, G. A² y Amorocho-Cruz, C. M ³

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos para combatir patógenos que afectan al ser humano constantemente va en aumento, lo que hace necesario la búsqueda de alternativas naturales para combatirlos. En la lista de patógenos con prioridad elevada desarrollada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se encuentra *Staphylococcus aureus*; el cual puede llegar a causar infecciones que van desde las más leves hasta mortales. Este estudio contiene los resultados de la evaluación bajo condiciones *in vitro* de la actividad antibacteriana de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) obtenidas del quesillo Huilense, la fermentación de café, la leche materna y de extractos de hojas de *M. Oleifera* frente al patógeno de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977 realizando métodos de difusión por pocillos y discos para obtener el porcentaje de inhibición. Adicionalmente, las cepas BAL mencionadas se evaluaron mediante antibiogramas empleando Penicilina G, Ceftriaxona y Ciprofloxacino. En relación a los resultados de la evaluación antibacteriana de los extractos de *M. Oleifera*, se evidenció que los tres extractos no tuvieron efecto inhibitorio frente a *S. aureus* ATCC BAA-977 en ninguna de las concentraciones evaluadas. Por el contrario, las BAL presentaron poder antimicrobiano frente a esta cepa patógena, destacándose las cepas BAL aisladas de la fermentación del café (L) con un 43,7 % de inhibición. Las BAL fueron sensibles ante los antibióticos evaluados, mostrando que en caso de utilizarse como probiótico podrían emplearse como una alternativa a la terapia antibiótica para tratar *Staphylococcus aureus*.

PALABRAS CLAVE: inhibición, patógeno, probiótico, antibiograma, alimentos funcionales.

[1] Estudiante de Ingeniería Agrícola. Universidad Surcolombiana- Neiva. Av. Pastrana Cra. 1ª. Agroindustria-USCO. u20151136943@usco.edu.co

[2] Ingeniero agrícola, auxiliar de investigación del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. gentilcollazosescobar09@gmail.com

[3] Profesor Asociado. PhD. Biotecnología. Programa Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Agroindustria-USCO. Claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

ABSTRACT

Resistance to antibiotics to combat pathogens that affect humans is constantly increasing, which makes it necessary to search for natural alternatives to combat them. In the list of high priority pathogens developed by the World Health Organization (WHO), there is *Staphylococcus aureus*, which can cause infections ranging from the mildest to deadly. This study contains the results of the *in vitro* evaluation of the antibacterial activity of Lactic Acid Bacteria (LAB) obtained from Huilense quesillo, coffee fermentation, breast milk and leaf extracts of *M. Oleifera* against the reference pathogen *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977 performing diffusion methods by wells and discs to obtain the percentage of inhibition. In addition, the LAB strains mentioned were evaluated using antibiograms using Penicillin G, Ceftriaxone and Ciprofloxacin. Regarding the results of the antibacterial evaluation of *M. Oleifera* extracts, they showed that the three extracts had no inhibitory effect against *S. aureus* ATCC BAA-977 in any of the concentrations evaluated. On the contrary, the LAB showed antimicrobial power against this pathogenic strain, highlighting the LAB strains isolated from the fermentation of coffee (L) with 43.7% inhibition. BAL were sensitive to the antibiotics evaluated, showing that if used as a probiotic they could be used as an alternative to antibiotic therapy to treat *Staphylococcus aureus*.

KEY WORDS: inhibition, pathogen, probiotic, antibiogram, functional food.

1. INTRODUCCIÓN

Los patógenos bacterianos ocasionan diversas enfermedades gastrointestinales, son transmitidos a los alimentos por falta de higiene; por lo tanto, son considerados un problema serio en la salud pública (Soto, Pérez y Estrada, 2015). Diversas investigaciones se han orientado en la búsqueda de alternativas a dichas enfermedades, dado la resistencia que presentan dichos patógenos a la terapia con antibióticos (Rodríguez, Zarate y Sánchez, 2017). *Staphylococcus aureus* fue uno de los primeros patógenos en presentar resistencia a los antibióticos, ya que desarrolló mecanismos variados para resistir los antimicrobianos de uso (Lacueva, 2017).

El género *Staphylococcus* se caracteriza por su morfología de cocos Gram positivos, diámetro de 0,5 a 1,5 µm, las células se visualizan solas o agrupadas en pares, tétradas, cadenas cortas o arreglo de estafilococo. (Cervantes, García y Salazar, 2014). En el ámbito médico, *S. aureus* es de importancia por ser uno de los principales patógenos para el ser humano (Bustos, Hamdan y Gutiérrez, 2006).

Staphylococcus aureus puede ser transmitido por actividades en contacto con animales o con sus productos, en la industria de la alimentación, actividades sanitarias, de laboratorio y está presente en varias partes del cuerpo humano como las fosas nasales, la garganta, los intestinos y la piel; puede causar infecciones cuando hay alteración de la barrera de la piel (Evangelista y Oliveira, 2015), tales como infecciones sistémicas y piógenas, infecciones agudas y crónicas y síndromes mediados por toxinas tanto en el cuidado de la salud como en la comunidad (Becker, 2018).

En relación a la Moringa, es una planta originaria de la India, es el género exclusivo en la familia *Moringaceae* (Vergara, Almatrafi y Fernández, 2017). Comprende 13 especie de climas tropicales y subtropicales, que se extienden en el tamaño de hierbas diminutas a árboles masivos. Esta especie es un árbol de madera suave y de crecimiento rápido que puede alcanzar 12 m de altura (Leone, Spada, Battezzati, Schiraldi, Aristil y Bertoli, 2015). La especie más extensamente cultivada es *Moringa Oleifera* (Vergara, et al., 2017). Se ha localizado al sur del Himalaya, extendiéndose a las otras regiones de la India, Bangladesh, Afganistán, Pakistán, Sri Lanka, sudeste asiático, Asia occidental, península Arábig, posiblemente los ingleses la llevaron a África, los franceses la introdujeron al Caribe, luego a Centroamérica y América del sur. Es de resaltar que en la zona tropical de América se cultiva como planta ornamental. (Bonaf, Rivera y Bolívar, 2012).

Sus múltiples empleos y potencial atrajeron la atención de agricultores e investigadores en eras históricas pasadas. La medicina tradicional dice que *Moringa oleifera* puede prevenir hasta 300 enfermedades y sus hojas han sido explotadas tanto para fines preventivos como curativos, ya que son ricas en minerales como calcio, potasio, zinc, magnesio, hierro y cobre (Leone, et al., 2015). Además, una investigación muestra que las vainas inmaduras contienen alrededor de 46,78% de fibra y cerca de 20,66% de proteína (Gopalakrishnan et al. 2016).

La Moringa es rica en nutrientes debido a la presencia de una variedad de fitoquímicos esenciales tales como taninos, esteroides, terpenoides, flavonoides, saponinas, antraquinonas, alcaloides y azúcares que están presentes en sus hojas, vainas y semillas. Algunos autores destacan la moringa como fuente de vitamina C, vitamina A, calcio, proteína, potasio y hierro en proporciones mayores que en naranja, zanahoria, leche, yogur, plátano y espinaca, respectivamente (Gopalakrishnan, Doriya y Santhosh, 2016).

Investigadores de Guatemala realizaron trabajos *in vitro* donde evidenciaron la inhibición de patógenos

como *Pseudomonas areuginosa* y *Staphylococcus aureus* mediante el uso de extractos acuosos de las hojas de moringa (Martín, C., Martín G., García, Fernández, Hernández y Puls, 2013).

Además, otros estudios en condiciones *in vitro* evidenciaron como los antioxidantes presentes en los extractos de hojas y semillas de moringa presentaron protección a las células vivas del daño oxidativo del ADN, asociado con el cáncer y enfermedades degenerativas. Adicionalmente, se menciona que dichos extractos inhiben la peroxidación lipídica y los mecanismos de comunicación entre patógenos o *Quorum sensing*, implicado en la adquisición de resistencia a ciertos antibióticos. En este sentido, la planta de *M. oleífera* resulta ser una materia prima útil para industrias como la farmacéutica, nutracéutica y de alimentos funcionales (Martín, *et al.*, 2013).

De otro lado, a principios del siglo XX surgió el concepto de Bacterias del Ácido Láctico (BAL) como grupo independiente. Hoy este grupo muestra un enorme potencial biotecnológico, y está presente en una gran cantidad de procesos alimentarios fermentativos destinados al consumo humano como lácteos, vegetales, carnes y productos de panadería, así como en ensilajes para alimentación animal (Sánchez, Barragán y Serna, 2020). Las BAL son bacterias Gram-positivas, morfología de cocos o bacilos, no forman esporas, catalasa negativa, aunque algunas cepas poseen la enzima pseudo-catalasa, por fosforilación de carbohidratos producen ácido láctico como principal metabolito eso cuando son homofermentativas, cuando producen ácido láctico, etanol, dióxido de carbono y otros ácidos orgánicos se denominan heterofermentativas (Cabeza, 2006).

Se sabe desde hace varias décadas que las BAL tienen un potencial inhibidor en los alimentos contra el desarrollo de microorganismos patógenos alteradores, lo cual es útil para prolongar la vida útil y aumentar la calidad higiénica de los alimentos (Sánchez, Barragán y Serna, 2020). De acuerdo a la FAO, 2001 los probióticos poseen microorganismos que además de nutrir, favorecen la salud de quien lo ingiere a nivel de sistema inmune, digestivo y respiratorio, en especial a población de alto riesgo como niños en el control de enfermedades infecciosas. Según Vélez, Gutiérrez y Montoya, 2015 los probióticos compiten con los patógenos por nutrientes por adherirse al epitelio y son inhibidos por la producción de ácidos orgánicos, etanol, diacetilo, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.

Los compuestos antimicrobianos producidos por BAL emergieron como un grupo prometedor de agentes para controlar el crecimiento de patógenos en alimentos (Tenea y Lara, 2019). La seguridad de los probióticos está relacionada con su uso previsto y las BAL pueden actuar como un conjunto de genes de resistencia a los antimicrobianos que podrían transferirse a los patógenos, ya sea en la matriz alimentaria o en el tracto gastrointestinal, lo que podría ser perjudicial para el huésped (Chetan Sharma, *et al.*, 2017).

Para garantizar que un microorganismo es probiótico la FAO sugiere evaluar las propiedades mediante la identificación de género, especie y cepa y estudios *in vitro* para seleccionar probióticos de uso en humanos, las pruebas que se recomiendan para cada cepa son las siguientes: resistencia a la acidez gástrica y sales biliares, adherencia a la mucosa intestinal y células epiteliales. Además, debe garantizar la seguridad de las cepas mediante pruebas como: I) Resistencia a antibióticos, verificando la ausencia de genes de resistencia transferible, II) Actividades metabólicas perjudiciales, III) Estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores, IV) Determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica, y la cepa pertenece a una especie potencialmente toxigénica, V) Ausencia de infectividad en animales inmunodeprimidos, VI) Determinar la dosis y la duración de la terapia y VII) Realización de pruebas aleatorias, ensayos en diferentes centros, doble ciego, controlado con placebo y con un apropiado diseño

estadístico (Amorocho-Cruz, 2011).

Los estudios de Serna, Valencia y Campos (2011) han propuesto las BAL como una alternativa natural para minimizar el uso de antibióticos. La prueba de susceptibilidad a los antibióticos es una medida *in vitro* para evaluar la probabilidad de que un agente antimicrobiano en particular trate una infección causada por un organismo específico. Los datos pueden predecir la terapia antimicrobiana empírica apropiada en una población particular. Este método de prueba se utiliza a menudo en el tratamiento de infecciones complicadas como las ocasionadas por el patógeno en estudio (Wanger, *et al.*, 2017).

Es de suma importancia encontrar alternativas naturales para combatir agentes patógenos que afecta la salud humana, aparte del valor nutritivo que podemos obtener de estas, se da facilidad a las familias que no pueden tener acceso a antibióticos, los cuales además están perdiendo su acción inhibitoria debido al desarrollo de resistencia por parte de los patógenos. Por esta razón, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto inhibitorio de las BAL obtenidas de diversos orígenes (quesillo, leche materna y proceso de fermentación de café) y de los extractos de hojas de *Moringa oleífera* deshidratadas frente a la cepa de referencia (*Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977).

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar diferentes alternativas naturales para combatir *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el efecto inhibitorio de los extractos obtenidos a partir del polvo de las hojas deshidratadas de *M. oleífera*, utilizando los solventes hexano, cloroformo y metanol frente a la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977

Evaluar el posible efecto inhibitorio de las BAL, obtenidas de diversos orígenes (quesillo, leche materna y proceso de fermentación de café) frente a la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas

3.1.1 Cepa patógena *Staphylococcus aureus* ATTC BAA-977

La activación del patógeno de la cepa de referencia *S. aureus* ATCC BAA-977 (KWIK STIK, Francia, Europa) se hizo con los siguientes pasos: siembra en triple estría con asa de platino en medio de agar TSA (Tryptone Soya Agar, Oxoid, Reino Unido), para el aislamiento de las colonias; la placa fue incubada (Heratherm IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 horas (Figura 1).

Orden de crecimiento del patógeno:

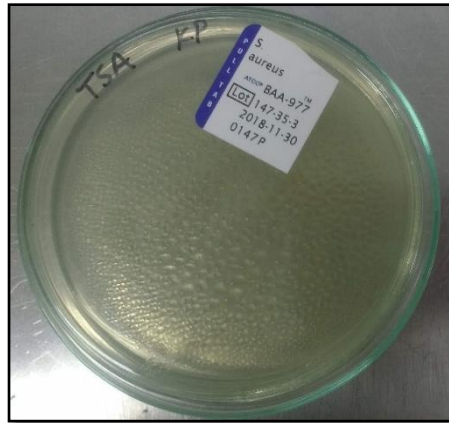


Figura 1. Activación del patógeno de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977

Se realizó siembra en masa sobre TSA (Tryptone Soya Agar, Oxoid, Reino Unido), incubando a temperatura de 37°C durante 24 horas, posteriormente se tomó una porción de crecimiento en placa que fue inoculado en 9 ml de agua de peptona (Merck KGaA, Alemania) se agitó en Vortex (Benchmark Scientific BV1000, Taiwán) hasta escala McFarland 0.5%. Se realizaron diluciones seriadas con volúmenes de 1000 µl entre tubos hasta la dilución -5, sembrando en superficie y realizando extensión con asa de platino un volumen de 100 µl. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. En todos los casos la siembra se realizó por duplicado (Figura 2).

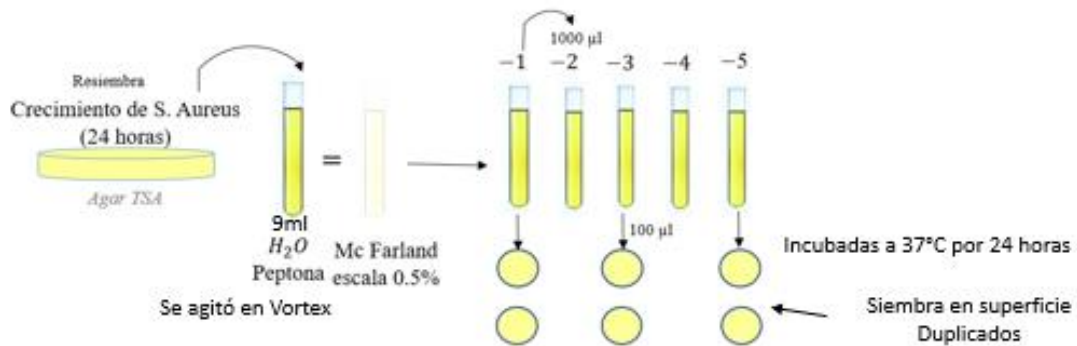


Figura 2. Esquema del ensayo de orden de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977

Recuento unidades de crecimiento microbiano

Se realizó el recuento de las colonias en placa para las diluciones que fueron empleadas. El orden de crecimiento de los patógenos fue determinado con la siguiente ecuación (1).

$$UFC. ml^{-1} = \left(\frac{NC}{0.1 ml * ND} \right) \quad (1)$$

Donde; NC es el número de colonias de crecimiento en placa, 0.1 ml corresponde al volumen de siembra V y ND es la dilución de conteo de colonias.

3.1.2 Cepas BAL

Las cepas lácticas empleadas fueron JC (leche materna), L y D (fermentación de café), 12 (quesillo huilense); conservadas a -20°C , tomadas de la colección de laboratorio de Microbiología de alimentos (Facultad de Ingeniería, Universidad Surcolombiana) procedentes de investigaciones previas. Las BAL L y D provienen del proyecto de investigación: Caracterización de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), hongos y levaduras que inciden durante el proceso de fermentación de café arábica (*Coffea arábica*) y su influencia en el análisis sensorial y calidad de la taza del proceso de fermentación de café arábica (Ladino, 2017); la BAL 12 procede de la investigación: Evolución de atributos de calidad en quesillo huilense en almacenamiento refrigerado (Cortés, 2015) y la BAL JC es proveniente de leche materna (Figura 3).

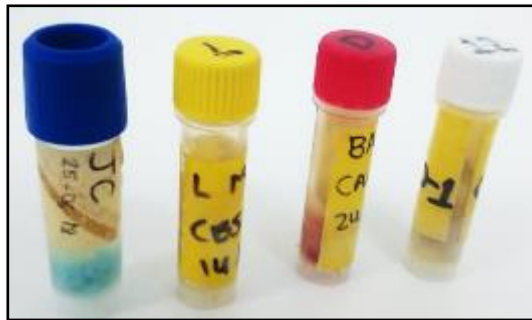


Figura 3. BAL (JC, L, D, 12) conservadas en crioviales a -20°C .

La activación se realizó tomando una porción de cada BAL aislada y sembrando en masa con asa de platino en medio de agar MRS (Man Rogosa Sharpe, Conda, España) y fueron incubadas (Heratherm IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 horas, al siguiente día se sembró en triple estría en medio de agar MRS para el aislamiento de las colonias. Posteriormente, se realizó siembra en superficie en medio de agar MRS; las placas fueron incubadas (Heratherm IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 horas en cada caso.

3.2 Ensayos de actividad inhibitoria

3.2.1 Evaluación de los extractos de hojas secas de *M. oleífera*

Los extractos de hoja deshidrata de *Moringa* fueron evaluados mediante la técnica de difusión de pocillos, se inocularon cultivos bacterianos del patógeno ajustados a 0.5% escala McFarland en medio TSA (Oxoid). Los extractos vegetales fueron preparados a diferentes concentraciones: hexano 10, 20 y $30\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{ml}^{-1}$, cloroformo y metanol (10, 30 y $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{ml}^{-1}$) y disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO-Panreac, Alemania) al 30%. El antibiótico Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200,000 U.I.), fue utilizado como control positivo del experimento y DMSO al 30% fue aplicado como control negativo. En todos los casos se adicionaron volúmenes iguales ($50\text{ }\mu\text{l}$) de los tratamientos a cada pozo.

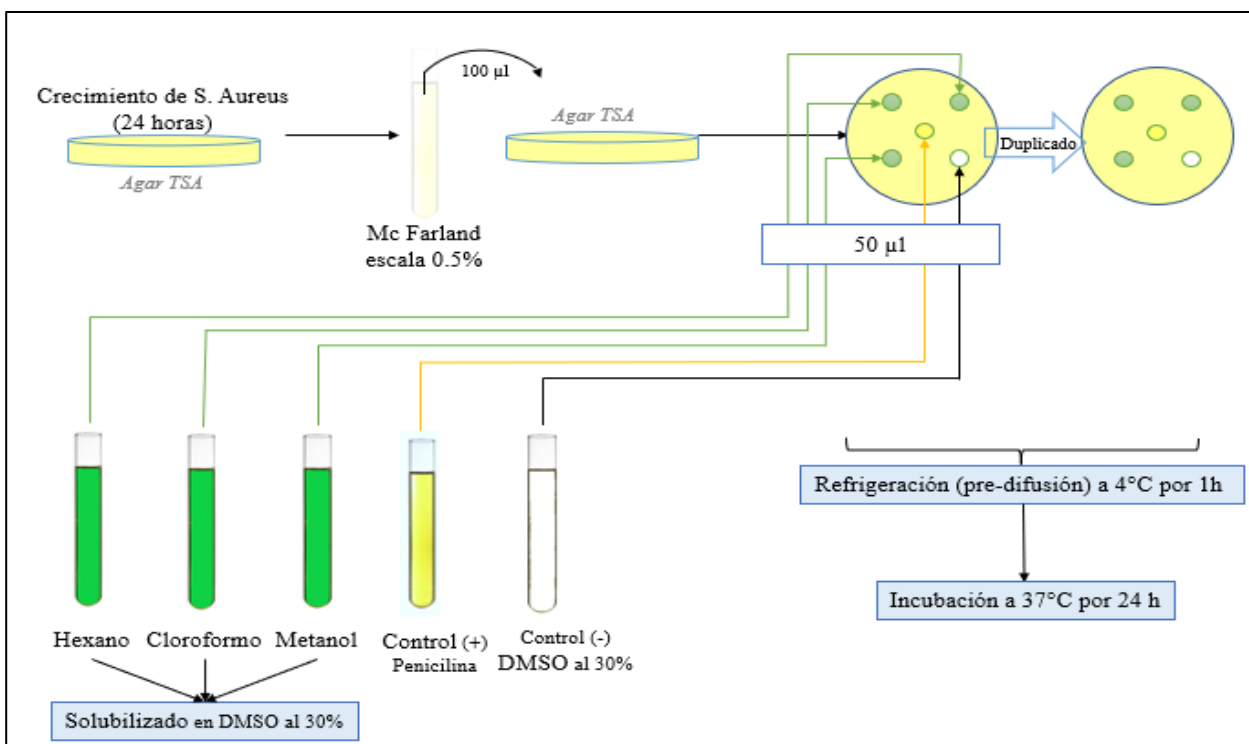


Figura 4. Esquema del ensayo de actividad antimicrobiana de los extractos de *M. oleifera* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977

Se cortaron cinco pocillos de 7 mm de diámetro usando un sacabocados estéril (Kheir, et al., 2014) en la placa de medio TSA (Oxoid) donde estaba inoculado en superficie el cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977 ajustado a escala McFarland 0.5%. Las placas se dejaron en refrigeración (Indufrial, Colombia) a ~4°C durante una hora (pre-difusión). Posteriormente fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. La zona de inhibición por los extractos se midió utilizando una regla en milímetros (Kheir, et al., 2014). En todos los casos se realizaron duplicados (Figura 4).

3.2.1.1 Extractos de hojas secas de *M. oleifera*

Los extractos de hojas secas de *M. oleifera* (hexano, cloroformo y metanol) que se utilizaron provienen del proyecto de investigación (Figura 5): Promoción del consumo de *Moringa oleifera* como complemento nutricional, atendiendo las propiedades antimicrobianas (Caviedes, 2019), realizado en el laboratorio de Microbiología de alimentos, Facultad de Ingeniería de la Universidad Surcolombiana.



Figura 5. Extractos vegetales de hojas secas de *M. oleifera*.

3.3.2 Evaluación en presencia de células BAL

Se evaluó la inhibición de los patógenos en presencia de células de las BAL, utilizando la técnica de difusión de discos. A partir de un cultivo puro de cada BAL (L, JC, D, 12), se realizó siembra en masa en agar MRS incubando a 37°C por 24 horas, para posteriormente realizar discos de 7 mm de diámetro con un sacabocados estéril (Kheir, *et al.*, 2014). De otro lado, a partir de una suspensión de *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977 en agua de peptona ajustado a 0.5% escala McFarland, se adicionaron 100 µl a una placa de PC y se realizó la siembra en superficie.

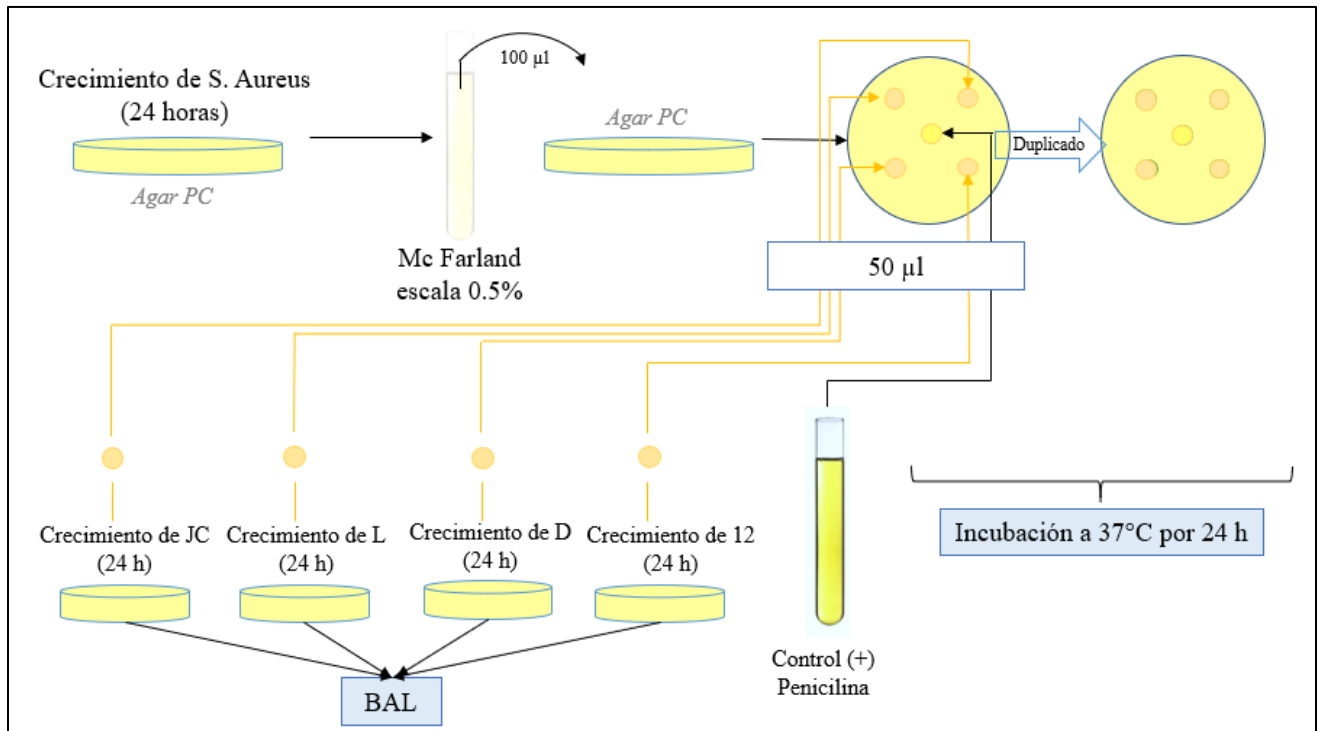


Figura 6. Esquema del ensayo de actividad antimicrobiana en presencia de células BAL contra *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977

Posteriormente, con un asa de platino se tomó un disco de cada una de las placas de las BAL y se depositaron los discos en la placa de PC. El control positivo se realizó haciendo un pocillo con un sacabocados estéril y adicionando 50 µl del antibiótico Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200,000 U.I.). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. La zona de inhibición por las BAL fue medida utilizando una regla en milímetros (Kheir, *et al.*, 2014). En todos los casos se realizó por duplicado (Figura 6).

3.2.3 Evaluación en ausencia de células BAL

Mediante la técnica de difusión de pocillos, se evaluó la inhibición de los patógenos en ausencia de las células de las BAL con pH ácido. Inicialmente se realizó un filtrado de células de las BAL, donde en cada caso se depositaron una porción de ellas (provenientes de un cultivo en masa de 24 horas en agar MRS), en tubos que contenían caldo de MRS (Broth, Oxoid, Inglaterra) llevándolas a escala McFarland 2%, incubando a 37°C durante 24 horas. Se adicionó 1.5ml de líquido en seis (6) tubos Eppendorf (Nest, china) por cada bacteria, para llevarlos a la microcentrifuga (Thermo Electron LED GmbH) a

6000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, con ayuda de jeringas y filtros de membrana de acetato de celulosa (CA) de 0,2 μ m (Sartorius stedim-Minisart, Alemania) se separó el sobrenadante, para obtener la sustancia libre de células (Figura 7).



Figura 7. A) Siembra de las BAL (L, D, JC, 12) en caldo MRS B) liquido sobrenadante de las BAL en eppendorf. C) Centrifuga

Luego, *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977 resuspendido en agua de peptona fue ajustado a 0.5% escala McFarland, y 100 μ l fueron adicionados a una placa de PC, sembrando en superficie. Posteriormente, en esta placa se hicieron 5 pocillos de 7 mm de diámetro usando un sacabocados estéril (Kheir, et al., 2014). Se adicionó 50 μ l de cada sobrenadante y en uno de ellos el antibiótico Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200,000 U.I.), como control positivo. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. La zona de inhibición por las BAL fue medida utilizando una regla en milímetros (Kheir, et al., 2014). En todos los casos se realizó por duplicado (Figura 8).

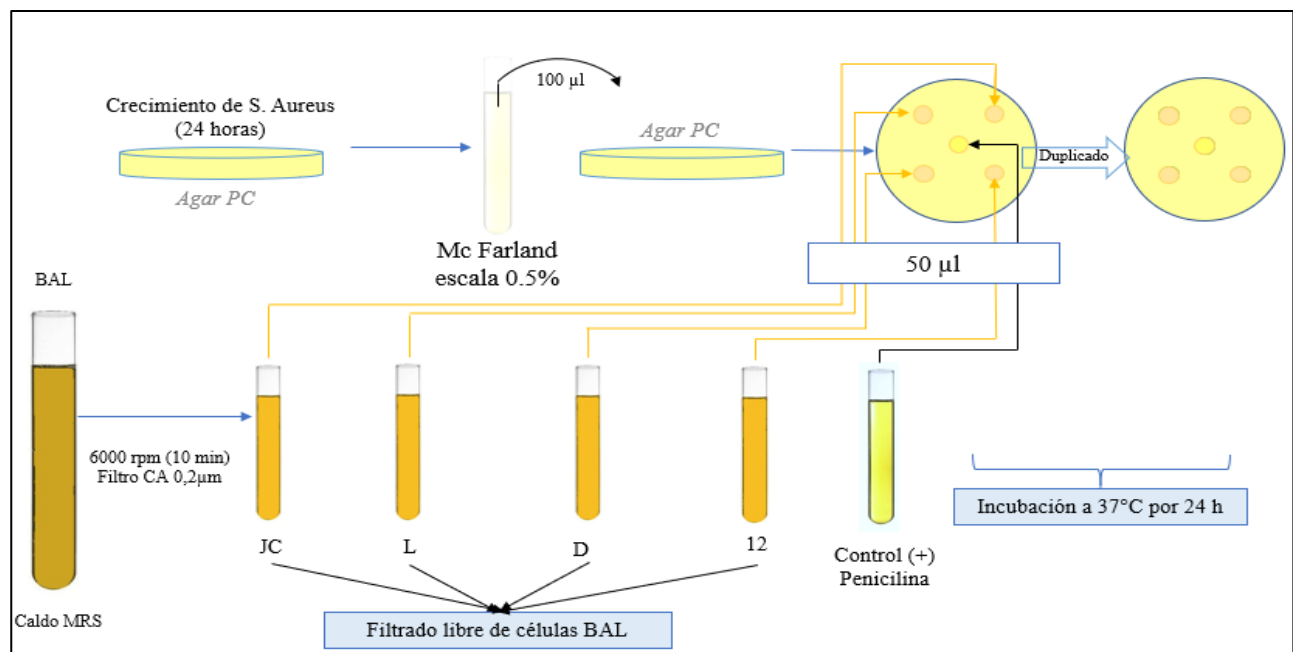


Figura 8. Esquema del ensayo de actividad antimicrobiana en ausencia de células BAL (pH ácido) contra *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977

3.3 Antibiogramas

Se realizó la evaluación de las BAL (L, JC, D, 12) mediante la técnica de difusión de pocillos con los antibióticos Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200.000 U.I.), Ceftriaxona (Nirlife-Aculife, India) y Ciprofloxacino (Bioquímico Pharma S.A, Colombia), en medio de agar MRS, donde se realizaron 3 pocillos 7 mm de diámetro con un sacabocados estéril (Kheir, *et al.*, 2014), en cada una de las placas de las BAL, en cada pocillo se adicionó 50 µl de cada uno de los antibióticos. Finalmente se llevó a incubación (Heratherm IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 17 horas. La zona de inhibición generada por los antibióticos se midió con una regla en milímetros (Kheir, *et al.*, 2014). La prueba en todos los casos se hizo por duplicado (Figura 9).

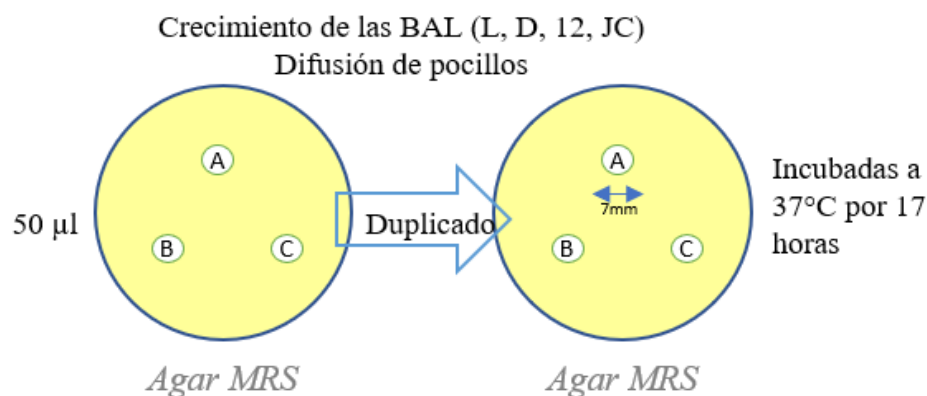


Figura 9. Esquema del antibiograma para cada BAL

Nota. **A:** Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200.000 U.I.). **B:** Ceftriaxona (Nirlife-Aculife). **C:** Ciprofloxacino (Benemid-Bioquímico pharma S.A).

Cálculo del porcentaje (%) de inhibición

Para demostrar la capacidad inhibitoria de las BAL y la susceptibilidad de estas frente a los antibióticos, se determinó mediante la siguiente ecuación (2). (Barragán, 2012)

$$\%IH = \left(\frac{\emptyset H_{ext} - \emptyset H_b}{\emptyset H_{cp} - \emptyset H_b} \right) * 100 \quad (2)$$

Donde;

ØHext: halo del extracto, **ØHb:** halo del blanco y **ØHcp:** halo del control positivo.

3.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo con el Programa StatGraphics Centurion 18.1.13 . Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) a los datos de inhibición para cada uno de los métodos, realizando pruebas de rango múltiple. Adicionalmente, se hizo un análisis de varianza ANOVA multifactorial para los resultados de actividad antimicrobiana de BAL en presencia y ausencia de células, con un nivel de confianza del 95%. Las diferencias entre medias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cepas

4.1.1 Cepa patógena *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977

Las colonias aisladas de *S. aureus* ATCC BAA-977 se caracterizaron por su forma circular con bordes enteros, de superficie lisa, consistencia cremosa, opacos, amarillosas y con diámetros de 1 a 2 mm de espesor. En la caracterización microscopía se observa cocos Gram positivos, en pares, tétradas, formando cadenas cortas y con un tipo de arreglo de estafilococos (Figura 10).

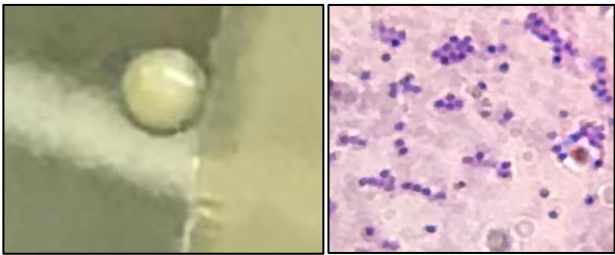


Figura 10. Fotografía macroscópica y microscópica de *Staphylococcus aureus* ATCC BAA - 977

Tabla 1. Orden de crecimiento de la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977

Patógeno	Tratamientos actividad antimicrobiana	Log UFC·ml ⁻¹
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-977	Extractos de <i>M. oleifera</i>	8.39 ± 0.00
	BAL en presencia y ausencia de células (pH ácido)	7.06 ± 0.20

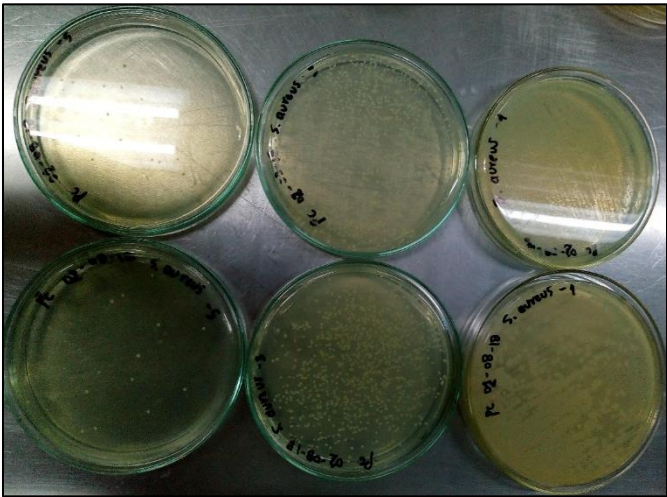


Figura 11. Orden de crecimiento de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC BAA - 977

4.1.2 Cepas BAL

Las cepas nativas L, JC, D y 12 tienen las siguientes características macroscópicas y microscópicas:

Cepa L (Figura 12), tiene colonias de color blanco opaco, con diámetro de 8 mm de forma circular con apariencia de anillos concéntricos, su morfología corresponde a bacilos y es Gram positiva, lo cual coincide con los publicado por Ladino, 2017.

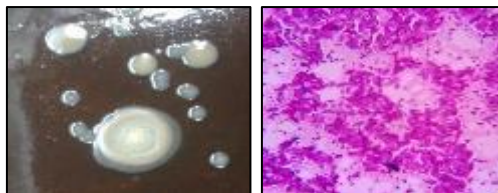


Figura 12. Fotografía macroscópica y microscópica de la cepa L (Ladino, 2017)

Cepa JC (Figura 13), tiene colonias de características circulares, cóncavas, amarillosas, lechosas, con diámetros de aproximadamente 1 mm de espesor. En la caracterización microscopia se observa cocos, las células son de tipo Gram positiva al igual a lo indicado por Cortés, 2019.

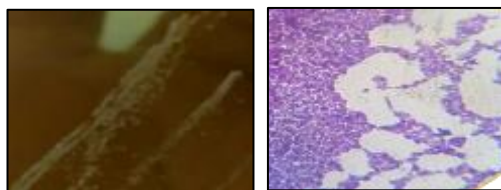


Figura 13. Fotografía macroscópica y microscópica de la cepa JC (Cortés, 2019).

Cepa D (Figura 14), tiene colonias de color blanca lechosa, con diámetro 4 mm de forma circular definida, la morfología de las células corresponde a bacilos cortos con extremos lisos – sin agrupación, Gram positiva similar a lo indicado por Ladino, 2017.

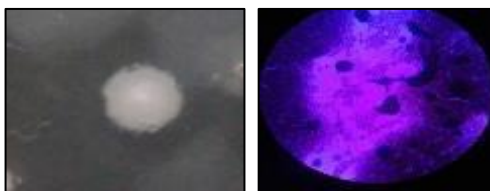


Figura 14. Fotografía macroscópica y microscópica de la cepa D (Ladino, 2017).

Cepa 12 (Figura 15), tiene colonias de forma redondeada de color blanco en la periferia, en el centro color lechoso, con diámetro de 3 mm, presenta forma de bacilos, es Gram positiva (Cortés, 2015).

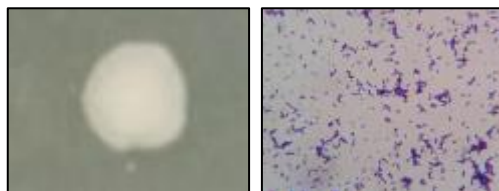


Figura 15. Fotografía macroscópica y microscópica de la cepa 12.QYB20-1 (Cortés, 2015)

4.2 Ensayos de actividad inhibitoria

4.2.1 Evaluación de extractos de hojas secas de *M. oleífera*

Los extractos vegetales y las concentraciones evaluadas se presentan en la tabla 2, donde se evidencia resistencia de la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* a los extractos; de igual forma se observa el efecto inhibitorio en el control positivo; con halos de inhibición considerables frente al patógeno y el control negativo sin efecto frente al patógeno como se esperaba (Figura 16). Los resultados evidencian que los extractos de moringa obtenidos con hexano, cloroformo y metano no tienen la capacidad de inhibir a *S. aureus* ATCC BAA-977 cuando la población es de $8.39 \pm 0.00 \text{ Log UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$ (tabla 1). Kheir *et al* (2014) publicaron potencial bactericida de extractos de semilla de Moringa en alcohol y agua, seguido en menor medida del extracto de hojas y flores en alcohol. Respecto al extracto de hojas en alcohol obtuvieron una concentración mínima inhibitoria de $62.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{ml}^{-1}$, evidenciando halos de inhibición de 7 mm con concentraciones de $125 \mu\text{g} \cdot \mu\text{ml}^{-1}$ frente a *S. aureus* ATCC 25923. Adicionalmente, se obtuvo un comportamiento similar a Gomashe *et al* (2014) en extracto de cloroformo y metanol a $30 \mu\text{g} \cdot \mu\text{ml}^{-1}$, los autores informaron resistencia microbiana de *S. aureus* frente extractos de cloroformo, etanol y metanol de hojas de Moringa con concentración de $30 \mu\text{g} \cdot \mu\text{ml}^{-1}$ y sensibilidad a la Gentamicina a la misma concentración de los tratamientos. De esta manera, se considera apropiado incrementar las concentraciones de los extractos vegetales. El análisis estadístico de esta prueba no se realizó porque las concentraciones definidas de los extractos usados de *Moringa oleífera* no lograron inhibir el patógeno en estudio en ninguno de los casos.

Tabla 2. Zonas de inhibición de diferentes concentraciones de los extractos de *M. oleífera*

Patógeno	Extracto	Tabla 2. Zonas de inhibición de diferentes concentraciones de los extractos de <i>M. brevis</i>										
		Hexano			Cloroformo			Metano			Control negativo	Control positivo
		Concentración $\mu\text{g} \cdot \mu\text{ml}^{-1}$									Volumen 50 μl	
		10	20	30	10	30	50	10	30	50	Inhibición (mm)	
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-977		R	R	R	R	R	R	R	R	R	34,00 $\pm$ 0,27	

*R: resistencia. $\bar{x} \pm \text{D.E.}$ D.E: Desviación estándar

En otras investigaciones realizadas con extractos de moringa frente a otros patógenos, se encuentra lo publicado por Rahman *et al* (2009) en donde presentaron efecto inhibitorio de extracto de hoja fresca en etanol frente a *S. Sonnei* con concentraciones de $117.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{ml}^{-1}$ e informaron crecimiento microbiano con extracto de hoja seca a la misma concentración, además de sensibilidad de *S. Sonnei* a la tetraciclina. Walter *et al* (2011) presentaron actividad antibacteriana de los extractos de semillas de *M. oleífera*, los cuales tenían un espectro más amplio de actividad antibacteriana que los extractos de semillas de *M. ovalifolia* contra tres aislados bacterianos, así, *Bacillus cereus* (9 mm), *Enterococcus faecalis* (10 mm) y *Escherichia coli* (8 mm), a una concentración de 50 mg / ml.

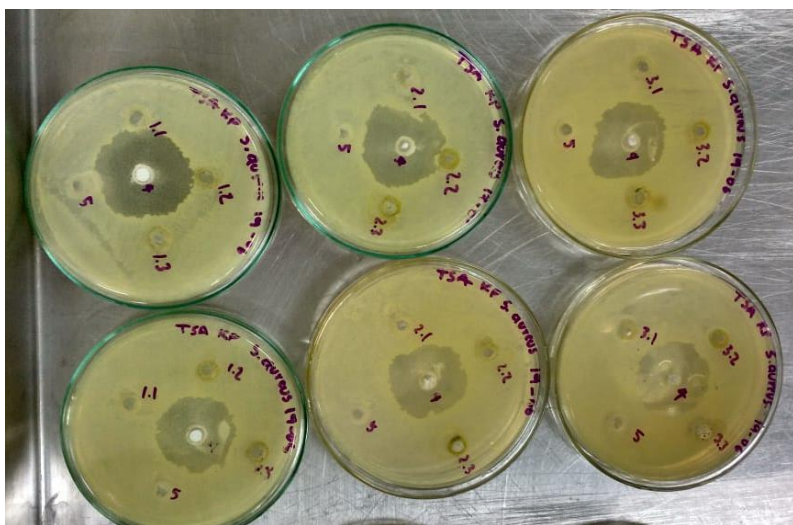


Figura 16. Ensayo de inhibición con extractos de *M. oleifera* contra *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977.

4.2.2 Evaluación en presencia de células BAL

Es evidente la formación de halos inhibitorios en las BAL; sin embargo, no tiene una zona elevada de inhibición frente al patógeno *Staphylococcus aureus* cuando la población es de 7.06 ± 0.20 Log UFC·ml⁻¹ presentado en la tabla 1. El control positivo tuvo un excelente comportamiento con un halo de diámetro de 42.5 ± 2.1 mm frente a *S. aureus*, mostrando que el antibiótico Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200,000 U.I.), es realmente seguro para combatir este patógeno (Figura 17), aunque *S. aureus* puede hacerse resistente a la mayoría de antibióticos empleados en monoterapia (Esp Quimioter, 2013). La tabla 3 presenta los resultados obtenidos en la evaluación de las BAL en presencia de células:

Tabla 3. Zona de inhibición de las BAL con el método de difusión de discos

BAL	L	JC	D	12	C. positivo
	<i>S. aureus</i> ATCC BAA-977				
Inhibición					Volumen 50 µl
(mm)	22.5 ±1.4	14.5±0.7	22.0 ± 0.7	15.7±3.2	42.5 ± 2.1
Zona (%)	43.7	21.1	42.2	24.5	100

$\bar{x} \pm D.E.$ D.E: Desviación estándar

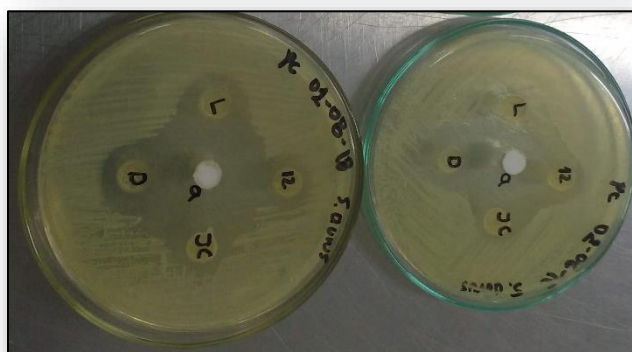
El mejor resultado de la prueba *in vitro* de la difusión de discos se logró con la cepa (L), la cual tuvo un 43,7% de inhibición, aunque estuvo muy cerca la cepa láctica (D) con un porcentaje de 42,2%; las cuales son BAL producto de la fermentación del café (Ladino G., 2017), y las BAL (JC Y 12) tuvieron un porcentaje de inhibición de 21,1 % y 24,5% respectivamente. Una acción antibacteriana se considera alta cuando su porcentaje de inhibición relativo es >70%, intermedia entre el 50-70% y baja cuando es <50% (Ramírez y Díaz, 2007); por tanto, las cepas ácido lácticas puestas a prueba en este método presentaron actividad antibacteriana baja.

Tabla 4. Pruebas de Múltiple Rangos para %IH por BAL (presencia de células)

Contraste	12-C+	12-D	12-JC	12-L	C+-D	C+-JC	C+-L	D-JC	D-L	JC-L
Diferencia de $\bar{x}$	-75,05	-17,45	3,85	-18,65	57,6	78,9	56,4	21,3	-1,2	-22,5
Significativa	*	*		*	*	*	*	*		*

*indica una diferencia significativa

En el análisis de varianza de una vía (ANOVA) se obtuvo un valor-P es menor que 0.05; por tanto, se afirma que, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las BAL evaluadas para el %IH. La prueba de múltiples rangos para %IH por BAL, muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las BAL L y D, al igual que con las BAL 12 y JC (Tabla 4); este resultado puede ser influenciado por el origen de cada cepa BAL.

**Figura 17.** Ensayo de inhibición en presencia de células BAL contra *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977.

4.2.3 Evaluación en ausencia de células BAL

En la tabla 5 se puede observar que las zonas de inhibición son más pequeñas en comparación con los resultados de la difusión de discos presentada en la tabla 3, y que presento sensibilidad para las BAL (JC y 12). Los ácidos orgánicos de las BAL (L y D) inhibieron el crecimiento del patógeno con un porcentaje de 32.9 % y 35.2%, respectivamente; por el contrario, los ácidos orgánicos de las BAL (JC y 12) no afectaron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* evaluado en la presente investigación. Es importante tener en cuenta que el efecto antimicrobiano que tienen las cepas nativas de BAL frente al patógeno *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977 es dependiente de estas mismas; por tanto, no se puede afirmar que todas las cepas nativas de queso, café y leche materna tengan esta actividad antimicrobiana frente al patógeno en estudio. Además, se confirma la acción del control positivo que presento un halo de 39.7 mm (Figura 18).

Tabla 5. Zona de inhibición de las BAL con el método de difusión de pocillos; $\bar{x} \pm S$.

BAL	L	JC	D	12	C. positivo
Inhibición	<i>S. aureus</i> ATTC BAA - 977				
	Volumen 50 µl				
	(mm)	17.7±1.1	-	18.5±0.7	-
Zona (%)	32.9	-	35.2	-	100

$\bar{x} \pm D.E.$ D.E: Desviación estándar

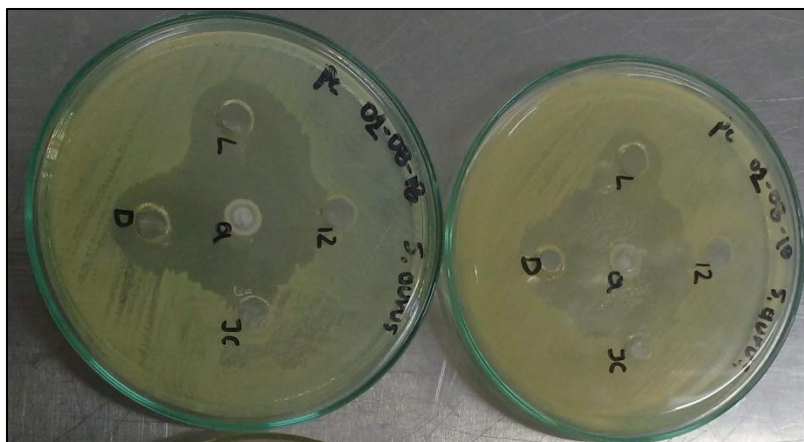


Figura 18. Ensayo de inhibición en ausencia de células BAL (pH ácido) contra *Staphylococcus aureus* ATTC BAA-977.

En el análisis de varianza de una vía (ANOVA) se obtuvo un valor-P menor a 0.05; por tanto, se afirma que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las cepas BAL evaluadas para el %IH. La prueba de múltiples rangos para %IH por BAL, muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las BAL L y D, al igual que con las BAL 12 y JC (Tabla 6); este resultado puede ser influenciado por la proveniencia de las BAL

Tabla 6. Pruebas de Múltiple Rangos para %IH por BAL (ausencia de células)

Contraste	12-C+	12-D	12-JC	12-L	C+-D	C+-JC	C+-L	D-JC	D-L	JC-L
Diferencia de $\bar{x}$	-100,0	-35,1	0	-32,85	64,9	100,0	67,15	35,1	2,25	-32,85
Significativa	*	*		*	*	*	*	*		*

*indica una diferencia significativa

En la Figura 19 se puede observar los porcentajes de inhibición de las BAL frente al patógeno, mediante las dos técnicas de difusión (Discos y Pocillos), el método más efectivo fue el de difusión de discos, lo que se evidenció con los porcentajes de inhibición mayores en comparación con los resultados del método de difusión de pocillos. Cabe resaltar que la presencia de las células de las cepas BAL evaluadas resultaron ser más efectivas que los ácidos orgánicos en la inhibición de *S. aureus* con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Figura 20).

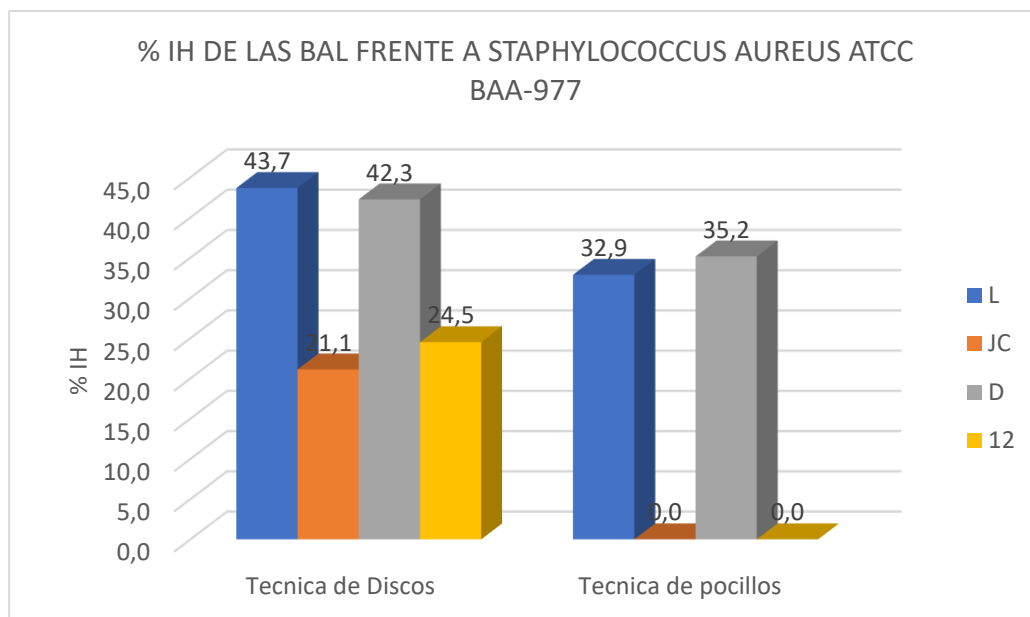


Figura 19. Porcentaje de inhibición BAL frente a *S.aureus*

Mediante ANOVA multifactorial para los factores BAL y método, se obtuvieron los valores-P, estos valores prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Los 3 valores-P son menores que 0.05, es decir, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre %IH con un 95% de nivel de confianza (Tabla 7). Se concluye así que el efecto inhibitorio de las BAL frente a *Staphylococcus aureus* ATCC BAA - 977 presenta diferencias significativas entre BAL y métodos.

Tabla 7. Valor-P de los factores BAL y método

	BAL	METODO	INTERACCIONES
Valor-P	0,0000	0,0000	0,0064

Se concluye así que el efecto inhibitorio de las BAL frente a *Staphylococcus aureus* ATCC BAA - 977 presenta diferencias significativas entre BAL y métodos.

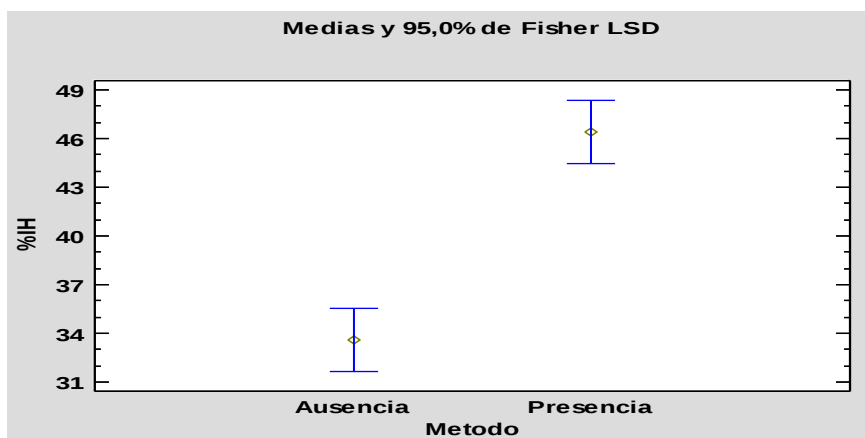


Figura 20. Medias del %IH de las BAL con los dos métodos de difusión

En la figura 21 se observa los resultados de cada una de las BAL evaluadas (L, JC, D,12) respecto al control positivo (Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200,000 U.I.)) con los dos métodos de difusión. De igual forma se evidencia que las BAL con un mayor grado de inhibición se encuentra en el método de difusión de discos; la cepa láctica aislada de la fermentación del café L es la que tuvo un mayor porcentaje de inhibición en el método anteriormente mencionado.

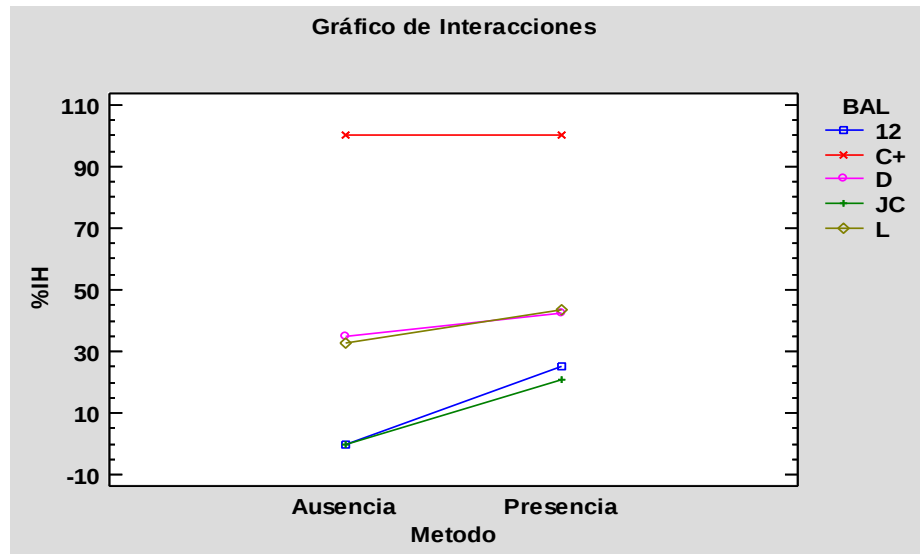


Figura 21. Gráfico de interacciones de las BAL con los dos métodos

Por otra parte, en el caso del método de pocillos (ausencia) la cepa láctica D es la que tiene un mayor porcentaje de inhibición a partir de sus ácidos orgánicos. Es importante tener en cuenta que el efecto antimicrobiano que tienen las cepas BAL frente al patógeno *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977 es dependiente de estas mismas; por tanto, no se puede generalizar la actividad antimicrobiana a todas las cepas lácticas aisladas de queso, café y leche materna.

Los resultados obtenidos de las BAL frente a *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977 por el método de difusión de pocillos en el caso de la BAL 12 (quesillo); coincide con los hallazgos en la evaluación de la actividad antimicrobiana de los péptidos sintetizados por las BAL en el crecimiento de *Salmonella spp.*, para garantizar calidad sanitaria del queso fresco, en el cual Cortes, Mejía y Oyola (2018), encontraron que las BAL evaluadas no mostraron actividad antimicrobiana frente al patógeno evaluado *Salmonella spp.* Pero, Vélez (2014), mediante el mismo método de difusión de pocillos encontró que el calostro de cerdas posee BAL cuyos extractos inhibieron el crecimiento de *Salmonella Thipymurium* y *Clostridium perfringens* en condiciones *in vitro*, presentando halos de inhibición mayores a 11 mm.

Amorocho-Cruz (2011), en su investigación donde aisló 131 BAL de leche de oveja Guirra y posteriormente encontró que *Helicobacter pylori* B6 con resistencia a la claritromicina fue inhibido por el 42% de las células de las cepas aisladas de oveja con diámetros de 11 a 22 mm; mientras que los ácidos orgánicos del 8% de las cepas lácticas presentaron actividad antimicrobiana frente al patógeno con diámetros de 13.8 a 24 mm. Solamente, el 1.5% de las cepas de oveja guirra inhibieron a *H. pylori* a pH ácido y neutro, es decir que poseen bacteriocinas que afectan a *H. pylori* con diámetros de 14-15 mm. Además, Cuvas, *et al.*, 2019 encontraron BAL aisladas de leche de cabra con actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella*; especialmente contra *E. Coli*.

Por otra parte, en el estudio de Capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle, se apreció el efecto inhibitorio de estas frente a *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *S. aureus* y la levadura *Candida albicans*, donde destacaron de la colección 55 cepas con producción de sustancias inhibitorias del crecimiento de los patógenos con diámetros de 14 a 15 mm (Rodríguez y García, 2017).

4.3 Antibiógramas

La tabla 8 presenta los resultados de la evaluación microbiológica para determinar la susceptibilidad o resistencia de las BAL con 3 tipos de antibióticos.

Tabla 8. Resultado del Antibiógrama

ANTIBIOGRAMA				
BAL Antibiótico	L	JC	D	12
A	36.5±0.3	28.2±0.1	56.5±0.1	48.5±0.8
B	28.5±0.4	34.2±0.2	41.2±0.2	39.7±0.2
C	26.0±0.1	33.2±0.0	32.7±0.2	39.1±0.1

$\bar{x} \pm D.E.$ D.E: Desviación estándar

Nota. **A:** Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200.000 U.I.). **B:** Ceftriaxona (Nirlife-Aculife). **C:** Ciprofloxacino (Benemid-Bioquimico pharma **S.A**).

En la tabla 8 se puede observar los resultados del antibiógrama realizado, el cual tiene como objetivo evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o a varios antibióticos, y traducir, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica (Cantón, 2010). Una interpretación de susceptible y resistente es muy importante en el tratamiento de infecciones graves, especialmente en pacientes con sistemas inmunitarios comprometidos o aquellos que están críticamente enfermos (Wanger, *et al*, 2017). Los resultados arrojaron que las BAL son sensibles a los antibióticos, así se asocia a una alta probabilidad de éxito terapéutico (Cantón, 2010). Por lo tanto, las BAL evaluadas presentan seguridad en términos de no transferir genes de resistencia a los patógenos, de esta manera la terapia antibiótica puede ser efectiva en un caso determinado.

Es importante tener en cuenta que las pruebas realizadas son cualitativas e *in vitro*. Por tanto, se hace necesario dar continuidad a estos estudios en condiciones *in vivo*; además, hace falta la identificación de género, especie y cepa para cada una de BAL en estudio; y así determinar en qué grupo se encuentran, ya que se subdividen en bacterias homofermentativas y heterofermentativas en función de los productos de su metabolismo. Al igual que realizar estudios HPLC para determinar la producción de ácidos orgánicos; Jurado y Guzmán (2014) al realizar este estudio para *Lactobacillus casei*, provenientes de muestras comerciales y cepas de leche con mastitis subclínica; obtuvieron una efectiva producción de ácido láctico por parte de la bacteria, y además de ácido cítrico, ácido acético y etanol en menores proporciones.

5. CONCLUSIONES

S. aureus ATCC BAA-977 no fue inhibido por los extractos de hojas deshidratadas de *Moringa* en hexano, cloroformo y metanol. Mientras que las células de las cepas lácticas aisladas de quesillo, leche materna y fermentación de café presentaron un porcentaje de inhibición bajo, al igual que los ácidos orgánicos producidos por las cepas L y D aisladas de café. Es de resaltar que las cepas BAL fueron sensibles a Penicilina, Ceftriaxona y Ciprofloxacino lo cual garantiza la no transferencia de genes de resistencia a patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

Amorocho-Cruz, C. M., (2011). Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra. (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Barragán, C. C. D., (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. <http://www.redalyc.org/pdf/579/57928310009.pdf>

Becker K., (2018). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*, Academic Press, p. 13-38, chapter 2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809671-0.00002-4>

Becker K., (2018). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*, Academic Press, p. 13-38, chapter 2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809671-0.00002-4>

Bonal Ruiz, Rolando, Rivera Odio, Regina Mercedes, & Bolívar Carrión, María Emilia. (2012). *Moringa oleifera*: una opción saludable para el bienestar. MEDISAN, 16(10), 1596-1599. Recuperado en 11 de septiembre de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192012001000014&lng=es&tlng=es.

Bustos J., Hamdan A. y Gutierrez M., (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco, Mexico. <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb061746.pdf>

Cabeza-Herrera, E., (2006). Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos starter para la industria láctea y cárnica. DOI: 10.13140/2.1.2241.2169

Caviedes-Losada, A. F., (2019). Promoción del consumo de *Moringa oleifera* como complemento nutricional, atendiendo las propiedades antimicrobianas (tesis de pregrado). Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia.

Cantón R., 2010. Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. Formación médica continuada DOI: 10.1016/j.eimc.2010.01.001

Cervantes E., García R., Salazar P., (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio. Consultado el 10 de febrero de 2019. <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>

Chetan Sharma, Sachin Gulati, Nishchal Thakur, Brij Pal Singh, Sanjolly Gupta, Simranpreet Kaur, Santosh

Kumar Mishra, Anil Kumar Puniya, Jatinder Pal Singh Gill, Harsh Panwar. (2017). Antibiotic sensitivity pattern of indigenous lactobacilli isolated from curd and human milk samples. DOI 10.1007/s13205-017-0682-0

Cortés-Macías, E. T., (2015). Evolución de atributos de calidad en quesillo huilense en almacenamiento refrigerado (tesis de pregrado). Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia.

Cortés-Gaona, M^a. P, 2019. Bacterias Ácido Lácticas y extractos de *Moringa oleifera* como alternativa para contrarrestar *Shigella Sonnei* ATCC 25931. (tesis de pregrado). Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia.

Cortés, J., Mejía, L., Oyola, Y., (2018). Evaluación del Efecto Inhibitorio de Extractos Obtenidos de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) Frente al Crecimiento de *Salmonella spp.* (Tesis de grado). Universidad Libre Seccional Pereira.

Cuvas, R., Cruz, M., Belmares, R., (2019). Aislamiento, Caracterización y Evaluación Antimicrobiana de Bacterias a partir de Leche de Cabra. Revista investigación y desarrollo en ciencia y tecnología de alimentos.UANL. Vol. 4.

Esp Quimioter, 2013. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. <https://seq.es/seq/0214-3429/26/sup/guia.pdf>

Evangelista, SÍntia de Souza, y Oliveira, Adriana Cristina de. (2015). *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad: um problema mundial. Revista Brasileira de Enfermagem , 68 (1), 136-143. <https://dx.doi.org/10.1590/0034-7167.2015680119p>

FAO, 2001. Food and Nutrition paper 85. Probiotics in food, health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Report of a joint FAO-WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina.

Gomashe, A. V., Gulhane, A. P., Junghare, P. M., Dhakate, A. N., (2014). Antimicrobial Activity of Indian Medicinal Plants: *Moringa oleifera* and *Saraca indica*. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. Consultado el 6 de agosto de 2018. <https://www.ijcmas.com/vol-3-6/Ashok%20V.%20Gomashe,%20et%20al.pdf>

Gopalakrishnan, L.; Doriya , K.; Santhosh, D. (2016) *Moringa oleifera* : una revisión sobre la importancia nutritiva y su aplicación medicinal. Ciencia de los alimentos y bienestar humano, pag. 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.04.001>

Jurado-Gámez, H. y Gúzman-Insuasty M., 2014. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* Y *Escherichia coli*. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, vol. 62, núm. 2, mayoagosto, 2015, pp. 23-39. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Bogotá, Colombia.

Kheir, M. S., Kafi, S. K., Elbir, H., (2014). The antimicrobial activity and phytochemical characteristic of moringa oleifera seeds, leaves, and flowers. World Journal of Pharmaceutical Research. Consultado el 5 de agosto de 2018. <https://www.researchgate.net/publication/2709632638>

Ladino-Garzón, W. L., (2017). Caracterización de las bacterias ácido lácticas (BAL), hongos y levaduras que inciden durante el proceso de fermentación de café arábica (*coffea arabica*) y su influencia en el análisis sensorial y calidad de la taza (tesis de pregrado). Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia.

Leone, A.; Spada, A.; Battezzati, A.; Schiraldi, A.; Aristil, J.; Bertoli, S. Cultivo, genética, etnofarmacología, fitoquímica y farmacología de hojas de *Moringa oleifera*: una descripción. En t. J. Mol. Sci. 2015, 16, 12791-12835.

Lacueva-Arnedo, M., (2017). Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*. Evolución y perspectiva actual. (Tesis de grado). Facultad de farmacia. Universidad Complutense. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MANUEL%20LACUEVA%20ARNEDO.pdf>

Martín, C., Martín G., García A., Fernandez, T., Hernández E., Puls, J., (2013). Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica. Vol. 36, No. 2, pp 137-149.

Rahman, M. M., Sheikh, I. M., Sharmin, A. S., Islam, S. M., Rahman, A. M., Rahman, M. M., Alam, F. M., (2009). Antibacterial Activity of Leaf Juice and Extracts of *Moringa oleifera* Lam. against Some Human Pathogenic Bacteria. Consultado el 5 de agosto de 2018. <http://cmuj.cmu.ac.th/sites/default/files/pdf/NaturalSciences/Volume%208,%20Number%202,%20July-December%202009/09%20Journal%202009%20V8-2.pdf>

Ramírez, L. y Díaz, H., 2007. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del “ruibarbo” (*Rumex conglomeratus*). Scientia et Technica. 13 (33): 397-400

Rodríguez-Pava, C., Zarate-Sanabria, A., Sánchez-Leal, L., (2017) Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. Grupa CEPARIUM. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00119.pdf>

Rodríguez, J., García, P., (2017). Capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle. Rev. Soc. Quím. Perú vol.83 no.4 Lima oct./dic. 2017.

Sanchez, J. ; Barragan, J. y Serna, L. Revisión de *Lactobacillus* en la industria alimentaria y sus medios de cultivo. Rev. colomb. biotecnol [en línea]. 2019, vol.21, n.2 [citado 2020-11-12], págs.63-76. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752019000200063&lng=en&nrm=iso.

Serna L.; Valencia L. y Campos R. Bacterias del ácido láctico con actividad antimicrobiana contra el agente patógeno causante de mastitis bovina. Rev.Bio.Agro [en línea]. 2011, vol.9, n.1 [citado 2020-11-12], págs.97-104. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612011000100012&lng=en&nrm=iso. ISSN 1692-3561.

Soto-Valera, Z., Pérez-Lavalle, L., Estrada-Alvarado, D., (2015). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. Salud Uninorte, Barranquilla. Volume 32. <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v32n1/v32n1a10.pdf>

Tenea, G., Lara, M., 2019. Compuestos Antimicrobianos Producidos por *Weissella confusa* Cys2-2 inhiben el Crecimiento de Bacterias Gram-negativas. *CyTA: Journal of food*, ISSN 1947-6337, ISSN-e 1947-6345, Vol. 17, N°. 1, 2019, págs. 105-111.

Vélez Zea, Juliana María, Gutiérrez Ramírez, Luz Adriana, & Montoya Campuzano, Olga Inés. (2015). Evaluación de la Actividad Bactericida de Bacterias Ácido Lácticas Aisladas en Calostro de Cerdas Frente a *Salmonella typhimurium*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(1), 7481-7486. <https://dx.doi.org/10.15446/rfnam.v68n1.47834>

Velez, J., (2014). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Bacterias Probióticas Extraídas del Calostro de Cerdas de Granjas del Aburrá Sur. (Tesis de magistral) Universidad Nacional de Colombia.

Vergara-Jimenez, M., Almatrafi, M. M., & Fernandez, M. L. (2017). Bioactive components in moringa oleifera leaves protect against chronic disease. *Antioxidants*, 6(4) doi:10.3390/antiox6040091

Walter, A., Samuel, W., Peter, A. y Joseph, O. (2011) Actividad antibacteriana de *Moringa oleifera* y *Moringa stenopetala* Extractos de semillas de metanol y n-hexano en bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por el agua. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 153-157.

Wanger, A., Huang, R., Actor, J., Chavez, V., Wahed A., Dasgupta, A. (2017). *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology: A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice* ISBN 978-0-12-805351-5