

1. TÍTULO DEL PROYECTO;

AISLAMIENTO DE LA BACTERIOCINA NISINA A POR PCR EXTRAÍDA DE *Lactococcus lactis* DE QUESO FRESCO.

2. INVESTIGADOR PRINCIPAL

MSc. Elizabeth Castaño Moreno

Docentes investigadores Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Microbiología

Grupo de Investigación Microbiotec, Microbiología y Biotecnología.

Auxiliares de Investigación

Lorena Becerra Obando

Melissa Cruz Soto

Estudiantes de Microbiología

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Gracias a la alta extensión geográfica, diversidad cultural y gran variedad gastronómica hacen de Colombia un lugar propicio para la elaboración del queso, el tamaño, olor, textura y color pueden dar indicios sobre su lugar de origen.

Ante la amplia producción de quesos nacionales, elaborados y comercializados en nuestro país, muchos de los productos son elaborados por pequeños y medianos productores, que ven en la fabricación de quesos una oportunidad de negocio, pero que es necesario que sea explotada a mayor escala cumpliendo con estándares de calidad y mejores prácticas de manufactura que brinden un producto inocuo para el consumo de la población colombiana.

En tiempos actuales la sociedad está tomando consciencia en la alimentación y sus implicaciones para la salud, adoptando hábitos alimenticios, de esta manera se empezó a asociar a los aditivos químicos como factores que pueden desencadenar problemas en el organismo del ser humano. Por esto y otros factores, la tendencia actual es el consumo de alimentos sin aditivos o que contengan aditivos naturales, eliminando el empleo de conservantes químicos en determinados alimentos y utilizando solo refrigeración como mecanismo primario de conservación, esto genera un riesgo potencial para el consumidor, especialmente si se considera la posibilidad de que se rompa la cadena de frío durante el proceso, la manipulación, la distribución y el almacenamiento de este tipo de productos.

La aparición constante de microorganismos patógenos emergentes, como por ejemplo la *Listeria monocytogenes*, que se desarrolla a temperaturas habituales de refrigeración de los alimentos y es causante de listeriosis en los seres humanos ha

incrementado el interés y la preocupación por mantener el control durante el proceso y manejo de los alimentos con el fin de garantizar su inocuidad.

Garantizar la inocuidad en un producto para el consumo humano no es que esté libre de microorganismos, porque existen microorganismos que son de gran ayuda para nuestro organismo por ejemplo los probióticos adicionados en yogures, inocuidad es garantizarle al consumidor que es un producto que no representa riesgo para su salud en el momento de consumirlo.

También contamos con la presencia de algunos péptidos antimicrobianos en este caso las bacteriocinas, que no atentan contra nuestra salud y adicionalmente ayudan a la preservación del alimento, ya que poseen un amplio espectro contra otro tipo de microorganismos que pueden estar presentes en el mismo producto.

Los logros del presente trabajo será la utilización del método de PCR para el aislamiento de las bacteriocinas Nisina y Lactococcina provenientes de *Lactococcus lactis*, aisladas de quesos frescos producidos a pequeña escala en los predios no certificados de los municipios del departamento de Risaralda.

Se plantea la pregunta: ¿Cómo la bacteriocina Nisina A puede funcionar como bioactivo en el proceso de conservación del queso fresco?

4. JUSTIFICACIÓN:

Actualmente las personas están siendo más conscientes de la alimentación y sus implicaciones para la salud, de allí que se haya asociado a los aditivos químicos como factores que pueden desencadenar problemas en el ser humano. Por estos y otros factores, la tendencia se está inclinando a consumir alimentos sin conservantes o que contengan aditivos naturales, eliminando el empleo de conservantes químicos en determinados alimentos y utilizando solo refrigeración como mecanismo de conservación, esto supone un riesgo potencial para el consumidor, especialmente si se considera la posibilidad de que se rompa la cadena de frío durante el proceso, la manipulación, la distribución y el almacenamiento de este tipo de productos. Por lo tanto, la creciente demanda de productos mínimamente procesados y listos para el consumo, los cuales son obtenidos generalmente sin el uso de aditivos, plantea un importante reto para la seguridad alimentaria ya que se requiere inhibir el crecimiento microbiano propio de productos crudos, manteniendo la calidad y la frescura de los alimentos. Por ello está adquiriendo más importancia el uso combinado de barreras contra el crecimiento de microorganismos que permitan obtener alimentos seguros sin afectar las propiedades organolépticas.

Según el codex alimentarius la dosis máxima del uso de nisina como aditivo en lácteos es de 500 mg/kg.

Ante la amplia producción de quesos nacionales, elaborados y comercializados en nuestro país, muchos de los productos son elaborados por pequeños y medianos productores, que ven en la fabricación de quesos una oportunidad de negocio, pero

que es necesario que sea explotada a mayor escala cumpliendo con estándares de calidad y mejores prácticas de manufactura, que brinden un producto inocuo para el consumo de la población colombiana.

El propósito del presente trabajo será la utilización del método de PCR para el aislamiento de la bacteriocina Nisina A proveniente de *Lactococcus lactis*, aisladas de quesos frescos producidos a pequeña escala en los predios no certificados de los municipios del departamento de Risaralda, para poder ser empleada en EL SECTOR LACTEO, y así aumentar la conservación de productos derivados de lácteos, ya que es el mejor conservante natural y podrán ser empleadas para prolongar la vida útil de diversos productos lácteos, evitando la alteración de las conservas.

5. OBJETIVOS:

Objetivo General:

Aislar la bacteriocina Nisina A de *lactococcus lactis* del queso fresco utilizando la técnica de PCR.

Objetivos Específicos:

Diseñar un plan de muestreo del queso fresco y una metodología completa del análisis.

Utilizar la técnica de PCR para la confirmación molecular de la bacteriocina Nisina A proveniente del *Lactococcus lactis subsp. Lactis* del queso fresco.

Describir como la Nisina A puede funcionar como bioactivo en el proceso de conservación del queso fresco.

6. MARCOS DE REFERENCIA:

QUESO

El queso puede definirse como un alimento lácteo obtenido por la coagulación enzimática de la leche con la subsecuente separación del suero. La FAO define al queso como un producto fresco o madurado que se obtiene por el drenado posterior a la coagulación de la leche, crema, leche parcial o totalmente descremada o combinaciones de estas; no obstante, esta definición excluye a los quesos obtenidos de suero.

La producción de quesos se inicia con las diferentes operaciones que permiten, como primer paso, la formación de un coágulo o cuajada de composición fisicoquímica determinada en cuanto a un extracto seco, contenido en materia grasa y minerales, acidez (pH) y textura. Posteriormente, estas propiedades del coágulo, bajo condiciones adecuadas de maduración (salado, temperatura, humedad,

aeración), favorecen el desarrollo de microorganismos naturales o inoculados y la acción de sus enzimas. Esta actividad biológica, ligada a la de las enzimas naturales de la leche y las coagulantes, provoca la transformación de un coágulo de leche con poco sabor y aroma en productos organolépticamente mucho más atractivos.

El queso fresco además de cumplir en general con las características anteriormente descritas también posee: alto contenido de humedad, no tiene corteza, vida útil corta, sabor suave, con o sin adición de ingredientes opcionales. Sobra decir que tanto el queso como todos los productos lácteos son de las contribuciones más importantes de la naturaleza a la población humana.

Se pueden distinguir cinco operaciones fundamentales comunes a la fabricación de quesos; la preparación de la leche, la coagulación, el escurrimiento, el salado y la maduración.

PREPARACIÓN DE LECHE PARA FABRICACIÓN DE QUESO

La leche es una mezcla de proteínas, grasas, carbohidratos, sales y agua en equilibrio dinámico. Los compuestos se encuentran en suspensión coloidal, en emulsión o en solución.

Los diferentes productos lácteos son preparados por la alteración de la composición y el estado físico de la leche. En la industria de los quesos, la calidad y la correcta preparación de leche son indispensables para obtener quesos de buena calidad microbiológica, nutricional y organoléptica y permite reducir los defectos de fabricación.

La composición de la leche depende de muchos factores, entre los que se pueden citar: tipo y raza de animal, hora de ordeño, periodo de lactancia, temporada del año y tipo de alimentación. El contenido en grasa y proteínas puede tener una influencia en la calidad del queso. El ajuste de contenido de grasa es practicado comúnmente para satisfacer los contenidos mínimos requeridos por las normas vigentes, uno de los factores decisivos en la correcta fabricación de queso es la posible presencia de antibióticos en la leche, estos tienen su origen en el tratamiento veterinario de los animales y puede afectar el desarrollo de las bacterias lácticas.

La leche puede sufrir un fuerte deterioro por contaminación y desarrollo microbiano. La leche obtenida bajo adecuadas condiciones higiénicas contiene, en general, menos de 5.000 ufc/ml. El ordeño origina la contaminación de bacterias coliformes y butíricas.

El equipo de ordeño, de transporte y de almacenamiento puede también contribuir a la contaminación bacteriana por fallas en diseño o limpieza. La refrigeración permite el control de gran número de microorganismos, pero favorece el desarrollo de la flora microtrófica.

Los tratamientos térmicos aplicados a la leche para eliminar la flora indeseable son una operación fundamental para muchos quesos. La termización (62 °C – 65° C durante 15 a 20 segundos) es preferida a la pasteurización para cierto tipo de quesos. La reducción del número de bacterias puede realizarse también por una

centrifugación asociada con el tratamiento térmico, esto permite la disminución de bacterias esporógenas termorresistentes, particularmente del género Clostridium.

COAGULACIÓN DE LA LECHE

Las caseínas de la leche (cerca del 80% de la proteína total) se encuentran en la leche bajo forma de micelas. Estos se encuentran compuestos por las diferentes fracciones proteicas (caseínas α , β y κ) caseínas derivadas de estos fragmentos peptídicos), por compuestos salinos (calcio y fosfatos), por citrato y por una función glucosídica. Las diferentes fracciones proteicas se distinguen entre sí por su composición, su carácter hidrofóbico y el número de grupos fosfoseriles.

Con el paso de los tiempos, estos derivados les han dado la posibilidad de supervivencia a las comunidades cuando se encontraban en periodos de escasez, esto es logrado gracias a la alta concentración de nutrientes que nos suministran los elementos vitales para mantener bien el estado de salud del organismo y son indispensables para vivir. Los productos derivados de la leche se pueden hacer de casi todos los mamíferos, pero el sabor, textura y apariencia pueden tener grandes diferencias.

Es importante tener en cuenta que para consumir este derivado de la leche, debe ser inocuo y para esto deben tener aditivos que le otorguen mayor conservación, pero en los consumidores ha crecido cada vez más el rechazo hacia los aditivos químicos por lo que la industria láctea ha tenido que estudiar nuevas estrategias de conservación. Una de esas estrategias es la del uso de sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas.

Desde el punto de vista tecnológico las bacteriocinas son las más adecuadas para su uso como conservantes de grado alimentario. Debido a su naturaleza peptídica se da la degradación por las enzimas digestivas, dando como resultado un producto inocuo para el consumidor y su microbiota intestinal que lo ocupa, en algunas ocasiones el espectro de acción de las bacteriocinas incluye a patógenos potenciales y alterantes asociados a los alimentos. También sus propiedades fisicoquímicas juegan un papel fundamental en la resistencia a los tratamientos térmicos y cambios de pH a los que están expuestos los alimentos al momento de su elaboración y almacenamiento.

En el momento de realizar la identificación de las bacteriocinas se utiliza el método de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), porque nos permite crear un número de copias de un segmento de ADN, que utiliza ciclos de desnaturalización, apareamiento con cebadores y extensión por una ADN polimerasa termo resistente para identificar la presencia de bacteriocinas.

Durante el proceso la mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, cada uno correspondiente de una fase de desnaturalización, una de hibridación o alineación y una de elongación. Durante la elongación la mezcla se calienta a 72°C y la enzima taq ADN polimerasa se usa para replicar las cebras de ADN, esta comienza el proceso de extensión de la cadena complementaria a partir del extremo 3' de los cebadores. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de ADN molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble.

La Nisina, descrita en 1928, fue la primer bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservante en alimentos; es la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe). Se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la producción de alimentos como un aditivo en productos lácteos para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria*.

Es un péptido de 34 aminoácidos, de bajo peso molecular menor a 5 kDa. La síntesis de la Nisina es compleja, requiere de procesos de transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, secreción, procesamiento, y señales de transducción. Existen dos variantes de esta bacteriocina, la Nisina A y la Nisina Z, que difieren solamente en el aminoácido de la posición 27, la histidina en la Nisina A cambia por Asparagina en la Nisina Z.

REVISIÓN MÉTODOLOGIAS PARA LA EXTRACCIÓN DE NISINA

El *Lactococcus* es un microorganismo autótrofo capaz de fermentar la lactosa y producir altas cantidades de ácido láctico, ya que contienen un complejo proteolítico que les permite hidrolizar la caseína, este exige un suministro exógeno de aminoácidos para su crecimiento, siendo incapaz de efectuar su síntesis a partir de una fuente nitrogenada mineral simple. Es capaz de producir algunas sustancias antibacterianas entre las cuales destacan la Nisina.

Medio para recuentos M17 (Broth) caldo

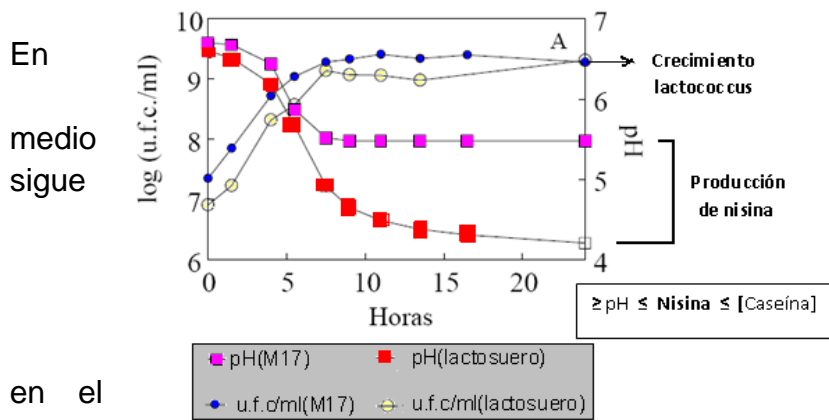
Crece a 37°C Caracterizado por su alta concentración de β -glicerato de sodio (19g/l), que permite un buen efecto tampón, pH 7.15 el crecimiento es rápido permitiendo un buen desarrollo de esta bacteria, no es necesario CO₂ como en otros medios.

Medios y técnica de identificación, Medio KEMPLER y McKAY

Se presentan como colonias blancas. Contiene lactosa (2mg/ml), arginina (4mg/ml) y purpura de bromocresol (0,05mg/ml) A base de leche contiene citrato de calcio y ferrocianuro potásico, las colonias citrato + son azules por precipitación de ferri-ferricianuro.

Medio de conservación M17 (Sólido)

Solución utilizada en la congelación con crioprotector glicerol (150mg/ml)



esta grafica existe una comparación entre el M17 y lactosuero donde la misma tendencia en ambos medios. Sin embargo, el pH disminuyó hasta alcanzar valores de 4.2 cultivo crecido en suero quesos mientras que en

M17 se estabilizó en 5.5.

La producción de nisina en ambos medios aumenta progresivamente a lo largo del crecimiento del lactococcus. No obstante, en los dos medios existe una disminución de los niveles de actividad una vez que las células alcanzan la fase estacionaria, formando el metabolito secundario (*nisina*).

TECNICA DE AISLAMIENTO PARA *lactococcus*.

- **Revivificación:**

Se toman 10ml de suero lácteo con 90 ml de caldo M17 se debe incubar en condiciones de anaerobiosis a 37°C por 72 horas en una estufa, para adaptar a los microorganismos que se encuentran dañados o debilitados.

- **Aislamiento:**

Realizar diluciones decimales desde 10^{-1} hasta 10^{-4} . Tomar el tubo de la dilución menos concentrada y sembrar por estriado en superficie con el medio selectivo y diferencial M17 agar por duplicado, las cajas se incubaran a 37°C por 48 horas, manteniendo las condiciones de anaerobiosis.

Realizar una resiembra con el mismo medio selectivo y diferencial M17 agar por duplicado para obtener cepas puras.

Para comprobar la pureza del cultivo, las colonias deben aislarse nuevamente en un medio no selectivo como agar nutritivo a una temperatura de 37°C por un día con el método de estrías, ya que en el medio selectivo M17 puede ocurrir que una colonia característica del microorganismo que estamos buscando pueda contener como contaminantes en muy bajo número otros microorganismos que no hayan crecido en este medio por estar inhibidos, pero al subcultivarlos en condiciones favorables puedan crecer.

Selección:

Se debe tomar las colonias que muestran distinta morfología en función tamaño, forma, borde, elevación, transparencia, color y velocidad de crecimiento.

Adaptación:

A los *Lactococcus* seleccionados se procede a pasar a suero de quesería pasteurizado suplementado con caseína hidrolizada obteniéndose mejores resultados de producción de nisina a una concentración de 15g por litro y a un pH menor de 5 después de 24 horas de fermentación según el Centro de Estudios y de Investigación en Biotecnología (CIBIOT) Colombia.

La **determinación de la biomasa** se realizó por peso seco:

Tarar cajas (105°C) y enfriar en desecador

Inocular cepas en medio líquido

Previo a incubación retirar 5 ml para obtener blanco

Prepara inóculo concentración 1×10^2 cel/ml sembrar 24h

Retirar 5ml del inóculo inicial y filtrar, para obtener peso seco.

Incubar a temperatura a 30°C en anaerobiosis cada cepa

Por cada cierto tiempo retirar 5ml de suspensión y filtrar

Colocar el filtro en cajas y colocar en una estufa 105°C

Retirar la caja, enfriar y pesar.

La **actividad de la nisina** se evaluó por difusión de agar:

Un método comúnmente utilizado para estudiar la acción antimicrobiana es el método de difusión en agar.

Preparar una placa que contenga un medio con agar

Inocular de forma uniforme con el organismo control (*Listeria monocytogenes*)

A continuación, se colocan discos de papel filtro impregnado con concentraciones conocidas de los diferentes antibióticos.

El antibiótico difundirá desde el papel filtro al agar en forma radial.

Se incuba la placa por 18/24 horas a 37°C (respetar este parámetro, porque temperaturas menores pueden disminuir la velocidad del crecimiento del germen y la difusión del antibiótico dando halos irregulares.)

Preservación:

Las cepas de *Lactococcus* aisladas se transfieren a caldo BHI con glicerol (40% v/v) y se congelaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

Amplificación de los genes mediante la técnica de PCR

Se prepara la mezcla de reacción con:

34.95 uL de agua destilada estéril,

2.5 uL de MgCl₂ 50mM,

0.25 uL de la mezcla de dNTP,

2.5 uL de cada primer,
0.3 uL de *Taq* polimerasa
2 uL de la solución que contiene el ADN.
Volumen total: 43 uL

Las reacciones se realizan en un termociclador de la marca que tengamos preferencia.

Método:

Preparación de la muestra. En un tubo para PCR se agregan los siguientes reactivos:

El ADN molde, los iniciadores, los nucleótidos o dNTPs, la solución amortiguadora, el cloruro de magnesio (MgCl₂), el agua y el ADN polimerasa, se pueden agregarse otros compuestos que ayudan a la estabilidad de la polimerasa.

Paso 1. Mezclar los componentes de la reacción con un vórtex durante 4 segundos o dando unos golpecitos con el dedo o invirtiendo el tubo varias veces.

Después se debe centrifugar brevemente para reunir la mezcla en el fondo del tubo.

Amplificación.

Para este paso se deben colocar las muestras en el termociclador programado con las condiciones de amplificación que deben estar definidas previamente.

Desnaturalización inicial.

La temperatura y el tiempo se determinan de acuerdo a las características del ADN y de la ADN polimerasa utilizada, por lo general es entre 94 y 96 °C durante 5-10 minutos y es la que utilizaríamos.

Ciclos de la PCR. Se realizan ciclos sucesivos de desnaturalización, alineamiento y extensión, generalmente estas etapas se repiten 30 veces.

Desnaturalización, para que se dé correctamente se recomiendan temperaturas de 94 °C durante 30 segundos.

Alineamiento. Al disminuir la temperatura de incubación los iniciadores se unen al ADN molde en las zonas 3' complementarias. La temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los iniciadores: la concentración, el número de bases y el porcentaje de guaninas-citocinas. En la práctica, la temperatura de alineamiento que utilizaríamos es de 55 °C durante un tiempo entre 30 segundos.

Extensión. Esta etapa, consiste en la síntesis de la nueva cadena de ADN, a partir del extremo 3' del iniciador por acción del ADN polimerasa, empleando como sustrato los cuatro dNTPs. En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión la desarrollaríamos a 72 °C porque es la temperatura a la cual la *Taq* polimerasa (enzima que utilizaríamos en el método) alcanza su mayor actividad.

Extensión final. Generalmente, al terminar los ciclos, se realiza una última extensión de aproximadamente 5 minutos a 72 °C para permitir que la polimerasa termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos. Realizar electroforesis del producto obtenido.

MÉTODOS PARA CÉLULAS SOMÁTICAS EN CAMPO

Bueno, según las metodologías encontradas, existen:

Métodos basados en modificaciones físico-químicas: (variación de Ph, proteínas, determinación de lactosa, de cloruros etc) que no los tendríamos en cuenta en este caso, se necesita un método que se pueda realizar en campo.

Métodos basados en el agente etiológico: identificación microscópica como Recuento de células somáticas según Prescott – Breed del microorganismo (mastitis), o cultivos y pruebas específicas, es este caso necesitamos un método más práctico para evaluar células somáticas.

Métodos basados en el recuento de células somáticas:

Prueba de Whiteside como un método indirecto, en esta prueba la mezcla de leche con una solución de NaOH al 4% ocasiona que la leche se gelifique formando grumos que son visibles. Los grumos serán más grandes conforme la leche contenga mayor número de células somáticas. Para hacer más visible la reacción es conveniente usar una placa de acrílico negro que puede tener dibujada 4 cuadros de 3cm x 3cm, uno por cada cuarto (Ávila, 1984; Pérez, 1986).

Procedimiento:

- a) Colocar 5 gotas de leche fría en el centro del cuadrado y agregar 2 gotas de la solución de NaOH al 4%.
- b) Mezclar vigorosamente, dispersando la leche en el cuadrado por medio de un palillo. Continuar mezclando por alrededor de 20 segundos y dar lectura al resultado.
- c) Interpretar de acuerdo al siguiente Cuadro 1:

	mm de leche	Células somáticas / ml
Negativo	0	- 325,000
	Traza	300,000 - 600,000
	1 +	600,000 - 1, 000,000
	2 +	1, 000,000 - 2, 000,000
	3 +	más de 2, 000,000

Fuente: Pérez, 1986.

California Mastitis Test (CMT, por sus siglas en inglés) ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino lechero (Morresey, 1999; Radostits, 2000; Medina y Montaldo, 2003; Erskine, 2001; Bedolla, 2004b). Es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valorar groseramente el recuento de células de la leche. No proporciona un resultado numérico, sino más bien una indicación de si el recuento es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso (Blowey y Edmonson, 1995; Bedolla, 2004b).

Pasos a seguir para la realización de la Prueba de California para Mastitis:

1. Se desecha la leche del preordeño.
2. Se ordeñan uno o dos chorros de leche de cada cuarto en cada una de las placas de la paleta.
3. Se inclina la paleta de modo que se desecha la mayor parte de esta leche.
4. Se añade a la leche un volumen igual de reactivo.
5. Se mezcla el reactivo y se examina en cuanto a la presencia de una reacción de gelificación enjuagar la placa.

La Prueba de California es un método de diagnóstico que posee una sensibilidad del 97% y una especificidad del 93%.

Viscosímetro rotativo: Otro método indirecto de medición de células somáticas es el viscosímetro, que se basa en la adición de un reactivo específico (alquil aril sulfonato de sodio, solución al 2% de ingrediente activo) a la muestra de leche, con el cual se forma un gel en presencia de células somáticas. La viscosidad del gel se cuantifica mediante una bolita de acero que se desplaza por gravedad dentro del tubo del viscosímetro (Chile, Instituto de Normalización, 1979b). La edad y temperatura de almacenamiento de la muestra de leche influyen en los registros del viscosímetro, lo cual indica que el método debe usarse principalmente en muestras de leche fresca para evitar errores en los recuentos (Duir y Cox, 1977).

Y por último están los métodos instrumentales.

Revisando un poco las diferentes metodologías determinamos que, vemos más viable utilizar el método de california mastitis test o también podríamos la Prueba de Whiteside, Teniendo en cuenta la disponibilidad de reactivos e insumos de la universidad y lo apropiado en este caso para la salida a campo.

Listado para células somáticas

Prueba de Whiteside

Muestra de leche fría

Solución de NaOH al 4%

Una especie de Tabla oscura con 4 cuadros de 3cm x 3cm pitillos

California Mastitis Test

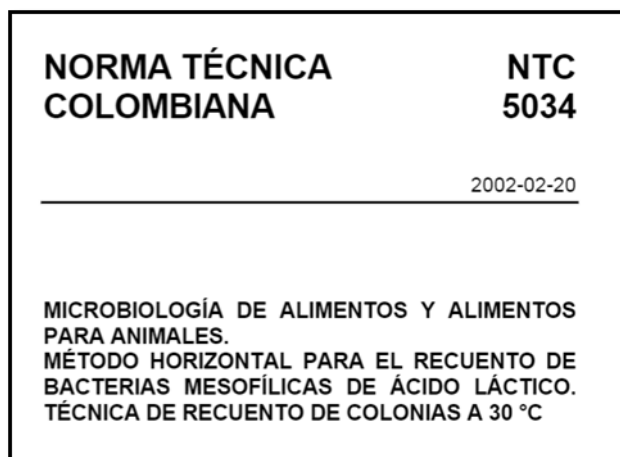
Muestra de leche

Una paleta

Reactivo CMT

NTC PARA MESÓFILOS

Bueno, no estamos seguras si esta es la norma que debemos seguir, pero tratándose de recuento de colonias para bacterias mesofílicas de ácido láctico, ya que sabemos que dentro de este grupo de bacterias estamos hablando de lactobacillus, lactococcus, streptococcus entre otras y por eso decidimos seleccionar estar.



Esta norma sugiere utilizar solo medio AGAR MRS:

M.R.S. agar: fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe, es un medio de cultivo que permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

Siembra

En profundidad, con doble capa: Sembrar 1 ml de la muestra y de sus diluciones decimales en placas de Petri, añadir 15 ml de medio fundido y dejar solidificar. Añadir otros 5 ml del medio y dejar solidificar de nuevo. Incubar a 37 °C

aproximadamente, durante 3 días o bien a 30 °C aproximadamente, durante 5 días, preferentemente en atmósfera de microaerofilia.

9. PROCEDIMIENTO

9.1 MUESTRA DE ENSAYO, SUSPENSIÓN INICIAL Y DILUCIONES

Se prepara la suspensión inicial y las diluciones de acuerdo con la NTC 4491.

9.2 INOCULACIÓN E INCUBACIÓN

Notas:

- 1) Puede aplicarse la siembra por estría en la superficie en combinación con la incubación bajo condiciones anaeróbicas o microaeróbicas en lugar del procedimiento de placa en profundidad. Se puede emplear la jarra de anaerobiosis o su equivalente, para obtener las condiciones apropiadas.
- 2) También es posible emplear un medio MRS de doble capa.

9.2.1 Se toman dos cajas de Petri estériles (véase el numeral 6.3). Empleando una pipeta estéril (véase numeral 6.4), se transfiere a cada caja 1 ml de muestra de ensayo si el producto es líquido, ó 1 ml de la suspensión inicial en caso de otros productos.

Se toman otras dos cajas de Petri estériles. Empleando una pipeta estéril, se transfiere a cada caja 1 ml de la primera dilución decimal de la muestra de ensayo si el producto es líquido, ó 1 ml de la primera dilución decimal de la suspensión inicial en el caso de otros productos.

Se repite el procedimiento descrito con las diluciones posteriores, empleando una pipeta estéril para cada dilución decimal.

Nota. Si se esperan números elevados de bacterias de ácido láctico, es posible inocular solo aquellas diluciones necesarias para poder enumerarlas de acuerdo con el caso general (véase el numeral 10.1).

9.2.2 Se vierte en cada caja de Petri aproximadamente 15 ml del medio MRS (véase el numeral 5.3) que se ha preparado y luego enfriado a aproximadamente 47 °C en el baño de agua (véase el numeral 6.5).

Cuidadosamente se mezcla el inóculo con el medio y se permite que la mezcla se solidifique.

9.2.3 Se invierten las cajas preparadas y se incuban en la incubadora (véase el numeral 6.2) ajustado a 30 °C durante 72 h ± 3 h.

Se evita la desecación del agar durante la incubación de modo que el medio no se haga demasiado inhibitorio.

Después de la incubación se realiza el recuento de colonias.

NTC PARA COLIFORMES TOTALES Y FECALES

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA	NTC 4458
2007-12-12	
<hr/>	
MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS Y DE ALIMENTOS PARA ANIMALES. MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECUENTO DE COLIFORMES O <i>Escherichia coli</i> O AMBOS. TÉCNICA DE RECUENTO DE COLONIAS UTILIZANDO MEDIOS FLUOROGÉNICOS O CROMOGÉNICOS	

Medio selectivo para coliformes: agar lactosa, bilis, rojo neutro, cristal violeta, VRBL

Medio selectivo para coliformes y e.coli: agar-lactosa-bilis-rojo neutro-cristal violeta, VRBL+ mug

<p>9. PROCEDIMIENTO</p> <p>9.1 SUSPENSIÓN INICIAL Y DILUCIONES</p> <p>Véanse las normas NTC 4491-1, NTC 4491-2, NTC 4491-3, NTC 4491-4 y la norma específica apropiada para el producto que interese.</p> <p>9.2 INOCULACIÓN E INCUBACIÓN</p> <p>9.2.1 Se toman dos cajas de Petri estériles (véase el numeral 6.3). Usando una pipeta estéril (véase el numeral 6.4), se transfiere a cada caja 1 ml de la muestra de ensayo, si el producto es líquido o 1 ml de la suspensión inicial en el caso de otros productos (véase el numeral 9.1).</p> <p>Se toman otras dos cajas de Petri estériles. Usando otra pipeta estéril, se transfiere a cada caja 1 ml de la primera dilución decimal (10^{-1}) de la muestra de ensayo, si el producto es líquido o 1 ml de la primera dilución decimal (10^{-2}) de la suspensión inicial en el caso de otros productos.</p> <p>Se repite el procedimiento descrito con las diluciones adicionales, usando una pipeta estéril para cada dilución decimal.</p> <p>9.2.2 Se vierten aproximadamente entre 10 ml a 15 ml del medio (véase el numeral 5.3), a $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, en cada caja de Petri. El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial (o de la dilución 10^{-1} si el producto es líquido) y el momento en que el medio (véase el numeral 5.3) se vierte en las cajas no debe ser mayor de 20 min.</p> <p>Cuidadosamente se mezcla el inóculo con el medio y se deja solidificar la mezcla, estando las cajas de Petri sobre una superficie horizontal fría.</p> <p>9.2.3 Después de que se complete la solidificación, se vierten aproximadamente 4 ml de medio de cultivo que cubra la superficie (véase el numeral 5.3, 5.4, 5.5) a $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, sobre la superficie del medio inoculado. Se deja solidificar como se describió anteriormente. Se pretende dejar una doble capa para visualizar mejor las colonias.</p> <p>9.2.4 Se invierten las cajas preparadas y se incuban a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.</p> <p>9.2.5 Si el objeto del análisis es solo la determinación de <i>E. coli</i>, para una mejor recuperación de bacterias injuriadas, incuban a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (si son productos lácteos incuban a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) las primeras 4 horas y después incuban a $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 h a 20 h.</p>

9.3 RECUENTO DE LAS COLONIAS

Después del período especificado de incubación (véase el numeral 9.2.4), se cuentan las colonias coliformes características en cada caja que contenga no más de 150 colonias³, ya sean características o no, usando el equipo para el recuento de colonias.

Mediante la utilización de una lámpara de fluorescencia de 360 nm a 366 nm hacer la lectura de las bacterias *E. coli* fluorescencia positiva.

NOTA Después de la incubación durante 24 h, las colonias características son de color rojo púrpura con un diámetro de 0,5 mm o mayor, y algunas veces están rodeadas de una zona rojiza de bilis precipitada.

³ Por encima de este número existe el riesgo de que las colonias coliformes tengan una apariencia atípica.

10. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Después del periodo especificado de incubación (véanse los numerales 9.2.4 para coliformes y 9.2.5 para *E.coli*), realizar el conteo de coliformes, incluyendo la *E. coli* y expresar independiente el conteo de bacterias coliformes del conteo de bacterias *E. coli* glucoronidasa positivas, utilizando el equipo para el recuento de colonias (véase el numeral 6.6).

10.1 *Escherichia coli* - medio fluorogénico

Examinar las cajas de petri usando una lámpara de luz ultravioleta (preferiblemente de 6 watos, de onda larga (366 nm)).

La presencia de fluorescencia es una prueba positiva para *E. coli*.

Si la fluorescencia es cuestionable incubar por un periodo adicional de 4 h para la prueba con ONPG y hasta por un periodo adicional de 20 h para verificar la fluorescencia intensificada como prueba de resultado positivo.

10.2 *Escherichia coli* – medio cromogénico

Examinar las cajas de petri que presentan colonias de color azul verdosas (T,B,X, D glucorónido). Se presume que la prueba es positiva para la presencia de *E. coli*.

10.3 *Escherichia coli* – medio agar con triptona bilis x glucorónido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-glucuronido

Examinar las cajas de petri que presentan colonias de color verde azuladas (D-glucorónido). Se presume que la prueba es positiva para la presencia de *E. coli*.

Bibliografía

Martínez Fernández, B. (1996). Tesis Doctoral. Bacteriocinas de Lactococcus Lactis Aislados de quesos Asturianos: Nisina Zy Lactococina 972. Oviedo, España: universidad de Oviedo.

GARCÍA GARIVAY, QUINTERO RAMÍREZ Y LÓPEZ MUNGIA. Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa. Pag: 316-317.

Mullis KB. The unusual origins of the polymerase chain reaction. Sci Am. 1990; 262: 56-65.

Fernández Dumont, Antonio; Rodríguez Gómez, Juan Miguel (Contributor). Producción inducible de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V e interleuquina-2

en cepas de "Lactococcus lactis" productoras de nisina. , España: Universidad Complutense de Madrid, 2006. p xcix.

Sbodio, O.A.¹; Revelli, G.R.², coagulación de la leche. Desarrollo de un dispositivo para el "monitoreo"*online* del proceso. Avances en la Argentina, Rev. investig. agropecu. vol.38 no.3 Ciudad Autónoma de Buenos Aires dic. 2012