

**EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO A *Escherichia coli*
POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROVENIENTES DE QUESO FRESCO DE
LA REGIÓN CAFETERA DE COLOMBIA.**

JUAN DAVID VARGAS CASTRILLÓN

VALENTINA VERGARA URIBE

Trabajo de Investigación Como Requisito para Optar al Título de Microbiólogo

ASESOR

Dr. FERNANDO RAFAEL SILLER LÓPEZ

Universidad Libre Seccional Pereira

Facultad Ciencias de la Salud

Microbiología

2020

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	6
1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	7
2 JUSTIFICACIÓN	8
3 MARCO TEÓRICO	9
3.1 Queso fresco, composición y microbiota	9
3.2 Calidad de alimentos – normatividad regulatoria	10
3.2.1 Requisitos microbiológicos	10
3.3 Microbiología del microorganismo	11
3.3.1 Bacterias ácido lácticas	11
3.3.2 Taxonomía, morfología y generalidades bioquímicas	11
3.3.3 Estrés a temperaturas altas y bajas	12
3.3.4 Metabolismo de carbohidratos	13
3.3.5 Metabolismo de Nitrógeno	14
3.3.6 Capacidad antimicrobiana	15
3.4 Prueba de sensibilidad microbiana	18
3.5 Microorganismos patógenos asociados a quesos frescos.	18
3.6 <i>E. coli</i> como patógeno en quesos - interés en salud pública	19
3.7 Aplicaciones biotecnológicas de bacterias ácido lácticas	19
3.8 Caracterización de microorganismos	20
4 OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo general	24
4.2 Objetivos específicos	24
5 METODOLOGÍA	25
5.1 Obtención de quesos frescos	25
5.2 Obtención de bacterias ácido lácticas provenientes del queso	25
5.3 Activación de <i>E. coli</i> ATCC 25922 y <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	25
5.4 Prueba de antagonismo	26
5.5 Caracterización molecular de bacterias ácido lácticas	26
5.5.1 Extracción de ADN	26
5.5.2 Cuantificación de ADN	28

5.5.3	Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) para amplificación del gen 16S rRNA	29
5.5.4	Electroforesis	30
5.5.5	Secuenciación	30
5.6	Evaluación de la actividad antimicrobiana de la BAL sobre el Queso	30
5.6.1	Preparación queso fresco	30
5.6.2	Preparación de matriz para bacterias ácido lácticas	30
5.6.3	Lavado de BALs	31
5.6.4	Inclusión de las BALs en el queso fresco.	31
5.6.5	Identificación de actividad antimicrobiana	32
5.7	Análisis estadístico	33
6	RESULTADOS	34
6.1	Aislamiento y activación de la cepa M12, consorcio de bacterias ácido-lácticas.	34
6.2	Prueba de antagonismo de bacterias ácido lácticas frente a un patógeno	35
6.3	Caracterización de consorcio microbiano	37
6.3.1	Extracción y cuantificación de ADN	37
6.3.2	Electroforesis y verificación de la calidad de ADN	38
7	CONCLUSIÓN	42
8	RECOMENDACIONES	43
9	AGRADECIMIENTOS	44
10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Ingredientes de la leche y su cantidad mínima.	9
Tabla 2: Análisis composición de queso fresco por cada 100 gramos.	9
Tabla 3: Requisitos microbiológicos para el queso fresco.	10
Tabla 4: Clasificación de las bacteriocinas.	16
Tabla 5: Características generales de las bacteriocinas.	17
Tabla 6: Primers seleccionados para la amplificación del gen 16s rRNA.	30
Tabla 7: Preparación del máster mix para PCR.	30
Tabla 8: Composición de la matriz para ensayo <i>in vivo</i> .	32
Tabla 9: Determinación de pureza de ADN extraído.	38
Tabla 10: Cuantificación muestras de DNA extraídas por protocolo Bioline.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: árbol filogenético de bacterias ácido lácticas.	12
Figura 2: Vía heterofermentativa de bacterias ácido lácticas, fermentación heteroláctica.	13
Figura 3: Vía homofermentativa de bacterias ácido lácticas.	14
Figura 4: Representación molecular del ácido láctico (izquierda) y el ácido acético (derecha).	15
Figura 5: Esquematación del proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional.	21
Figura 6: Interpretación de ciclos de amplificación en el proceso de la PCR con el número de copias del gen de interés.	22
Figura 7: Protocolo para prueba de antagonismo.	26
Figura 8: Protocolo de extracción de ADN, lado izquierdo dado por Ecogen, QuickExtract™ DNA Extraction Solution; lado derecho dado por Bioline, Kit de extracción Isolate II.	27
Figura 9: Protocolo de extracción de ADN dado por el manual de uso RTP® Bacteria DNA Mini Kit, Stratec Molecular.	28
Figura 10: Procedimiento de prueba de antagonismo in vivo.	32
Figura 11: Crecimiento de la cepa M12 en agar MRS sin azul de anilina.	34
Figura 12: Crecimiento de bacterias ácido lácticas en agar MRS con azul de anilina al 0.2%.	34
Figura 13: Crecimiento de <i>E. coli</i> en agar EMB, identificación de cepa.	35
Figura 14: Crecimiento de la cepa M12 y <i>L. lactis</i> en agar MRS sin azul de anilina.	36
Figura 15: Identificación de halo de inhibición generado por <i>L. lactis</i> y M12 frente a <i>E. coli</i> .	36
Figura 16: Electroforesis producto PCR, muestra extraída por protocolo QuickExtract.	38
Figura 17: Electroforesis de productos de PCR, generados por el kit de extracción de Bioline.	39

RESUMEN

Los quesos frescos son un alimento sumamente propenso a la contaminación por diversos microorganismos ya que este presenta una microbiota alta debido a la leche cruda pues esta no pasa por un proceso de pasteurización previo para la elaboración del queso, por ello este proceso requiere de una total inocuidad para su elaboración y conservación. Las bacterias ácido lácticas son fermentadoras y productoras del ácido láctico, el cual es muy empleado en la industria para brindarle a algunos alimentos unas características y protegerlos contra la acción de otros microorganismos patógenos.

La presente investigación tuvo como objetivo la identificación de la capacidad de inhibición del crecimiento de *E. coli* en queso fresco por la presencia de bacterias ácido lácticas (BAL). La muestra de queso fresco fue obtenida de una quesera cuya leche provenía del municipio de Santa Rosa de Cabal, el análisis microbiológico fue realizado mediante una técnica de antagonismo para evaluar la capacidad de inhibición *in vitro* de BAL frente a *E. coli*, también se usaron técnicas moleculares para la caracterización del microbioma entre ellas PCR, cuantificación y secuenciación. Para la obtención de todos los resultados se tuvieron algunos inconvenientes ya que se terminó el semestre y por falta de tiempo no se pudieron observar los resultados hasta donde se tenían así que iniciando el siguiente semestre se realiza nuevamente el estudio, en el segundo ensayo pudimos avanzar un poco más logrando identificar la presencia de bacterias ácido lácticas en un queso fresco de la región, se evidenció que si hubo un efecto de inhibición de las BAL frente al crecimiento de *E. coli* se logró obtener la pureza de un ADN, una PCR positiva con un tamaño que va desde 1.3 a 1.5 kb; por otra parte, la prueba *in vivo* de inhibición, la caracterización molecular, la amplificación de PCR y la electroforesis no fue posible su realización por causas de la pandemia del COVID-19.

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Para la población uno de los principales riesgos a la salud son las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) las cuales constituyen un importante problema de salud pública, estas enfermedades son provocadas por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos patógenos o por las sustancias tóxicas que ellos producen (1). En el Sistema de Vigilancia y Control de Riesgos del Instituto Nacional de Salud de Colombia presentan aquellos alimentos más susceptibles a una contaminación por microorganismos, dentro de esta clasificación se encuentran los productos lácteos y sus derivados; dentro de los peligros enmarcados en la matriz láctea, se encuentra que diversos microorganismos patógenos tales como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella* spp, *Clostridium botulinum*, entre otros; son de alta prevalencia en este tipo de alimentos, por otra parte, las entidades de salud nacionales e internacionales, los han catalogado como principales patógenos de importancia en salud humana.

La presencia de *Escherichia coli* (*E. coli*) dentro de los alimentos es cada vez más preocupante para las entidades de salud, reconociendo que estas bacterias residen habitualmente en el intestino de personas sanas, pero según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) los tipos de *E. coli* que pueden causar enfermedades se propagan a través del agua contaminada, alimentos contaminados y del contacto con animales o personas, indicando una contaminación de fuente fecal, siendo esta el tipo de contaminación más peligroso actualmente (2). Dentro del espectro infeccioso en alimentos de *E. coli*, se puede mencionar que este grupo de bacterias predomina también en quesos y otros derivados lácteos, sin embargo, se conoce que el queso presenta su propia microbiota compuesta por mohos, levaduras y bacterias ácido lácticas, estas últimas influyen en condiciones tales como olor, sabor y color. Dentro de la microbiota natural del queso, se puede decir que está constituido mayoritariamente por bacterias de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Sreptococcus* y *Lactococcus*, las cuales también presentan una característica importante atribuida a la inhibición de crecimiento de algunos microorganismos.

En el desarrollo del proyecto “evaluación in vitro del efecto antimicrobiano a *Escherichia coli* por bacterias ácido lácticas provenientes de queso fresco de la región cafetera de Colombia” se plantearon las siguientes preguntas de investigación: ¿Hay bacterias ácido lácticas presentes en el queso fresco de la región con capacidad inhibitoria hacia *Escherichia coli*?; ¿Es posible identificar los géneros y especies de bacterias ácido lácticas mediante secuenciación de metagenoma?

2 JUSTIFICACIÓN

La inocuidad de los quesos frescos se puede determinar con la presencia o ausencia de microorganismos que afecten las características físico-químicas y microbiológicas, sin embargo, esta fuente alimenticia al igual que los otros derivados lácteos, presentan una microbiota que influye en sus características organolépticas; una de la gran parte de la microbiota del queso, es atribuida a las bacterias ácido lácticas las cuales son conocidas por brindarle características necesarias al queso y su capacidad de inhibir algunos patógenos relacionados directamente a esta matriz; la presencia de patógenos en el queso fresco puede reducir a gran medida las condiciones de inocuidad afectando directamente las características organolépticas y la vida útil del alimento. Para la industria alimentaria es de gran necesidad implementar técnicas que promuevan la vida útil del alimento y la disminución de patógenos que generen algún tipo de enfermedad en los consumidores.

Dentro de la capacidad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas, se manifiesta que los factores inhibitorios van desde sustancias químicas producidas por las vías metabólicas y la producción de péptidos con propiedades antimicrobianas, estos péptidos son conocidos como bacteriocinas, las cuales han sido estudiadas por su variedad en características biológicas y químicas y por la diversidad de organismos que las producen. La implementación de estas bacterias o las moléculas derivadas de ellas es un posible campo de aplicación en la agroindustria, pues las altas tasas de enfermedades transmitidas por alimentos provenientes de los quesos son relacionadas a todas estas prácticas de manipulación y preparación que van en contra de los lineamientos establecidos para efectuar un buen manejo de los productos y el desarrollo de estos.

Por otra parte, se conoce que las bacteriocinas al ser la principal fuente de inhibición de microorganismos, provienen de diversas especies de bacterias ácido lácticas, de esta manera, es importante caracterizar molecularmente aquellas cepas que presenten esta capacidad antimicrobiana, lo cual permite identificar la naturaleza de donde provienen estos factores inhibitorios donde actualmente trabaja la biotecnología en la generación de alimentos con consorcios microbianos, caracterizados, para prolongar la vida útil de los productos. Este trabajo permite ampliar el conocimiento de la capacidad antimicrobiana que presentan las bacterias ácido lácticas autóctonas de los quesos, funcionando también como un aporte a la salud pública y a la nueva visión de productos biotecnológicos de la implementación de estos microorganismos como bioconservantes en los alimentos.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Queso fresco, composición y microbiota

Se denomina queso a un producto lácteo que se elabora con la cuajada de la leche. La cuajada, a su vez, es una especie de crema que se genera cuando la leche se vuelve pastosa o se cuaja y es separada del suero; al madurar la cuajada, se produce el queso. De acuerdo con el origen y al tipo de producción, se consiguen diferentes clases de quesos. El queso fresco es aquel que no se refina ni se deja madurar; se trata de un queso blando y húmedo que conserva la mayor parte del suero y cuyo cuajado suele extenderse unas 24 horas. Estas características hacen que la conservación del queso fresco sea algo complicada. Por eso, en comparación a otros quesos, dura mucho menos.

Tabla 1: Ingredientes de la leche y su cantidad mínima.

	Fuente de los ingredientes	Proteína
Derivados o productos lácteos	De la leche: caseína, suero de leche, grasa (puede contener grasa de origen vegetal) y lactosa (55 g/l) agua para consumo humano.	Cantidad: mínimo de 22 g/l Caseína: 80% (mínimo 17.6 g/l)
Producto lácteo concentrado	De la leche: caseína, suero de leche, grasa (puede contener grasa de origen vegetal) y lactosa (110 g/l) agua para consumo humano.	Cantidad: mínimo de 44 g/l Caseína: 80% (mínimo 35.2 g/l)
Producto lácteo combinado	Sólidos de leche: proteína, caseína, suero de leche, grasa, lactosa.	Cantidad: mínimo de 15 g/l Caseína: 80% (mínimo 12 g/l)
	Otros ingredientes.	

Tabla adaptada de (Uscanga-Domínguez et al., 2019) (3)

Tabla 2: Análisis composición de queso fresco por cada 100 gramos

	Calorias	Proteínas (g)	Grasas (g)	Colesterol (mg)	Calcio (mg)	Potasio (mg)	Sodio (mg)	Vitamina D (ug)
Queso fresco	200 Kcal	14.03	14.9	14.5	190.5	200	294	0

Tabla adaptada (3)

La leche es la fuente alimenticia inicial de los derivados lácteos y es ideal para la proliferación de microorganismos debido a su composición esencialmente de glucosa y lactosa, la presencia de aminoácidos, vitaminas y otros compuestos que son fuentes nutricionales para bacterias y levaduras; cuando la leche pasa por el proceso de pasteurización, disminuye notablemente la carga microbiana autóctona, sin embargo, algunas bacterias permanecen viables formando la microbiota inicial de los productos lácteos (4); la microbiota dominante en el queso fresco está constituido por una diversidad de bacterias ácido lácticas (BAL), mohos y levaduras. Entre las BAL más frecuentes se encuentran los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Sreptococcus* y *Lactococcus*, a las que se le atribuye la producción de sustancias inhibitorias de patógenos transmitidos durante el proceso de fabricación del queso fresco.(3); por otra parte, se conoce que muchos de los microorganismos encontrados en los quesos, forman parte de los cultivos iniciadores, permitiendo el proceso de acidificación y formación del queso (5).

3.2 Calidad de alimentos – normatividad regulatoria

En Colombia la producción de queso fresco se encuentra regulada por la Norma Técnica Colombiana (NTC) 750, donde inician definiendo al queso fresco como un producto higienizado, sin madurar, que después de su fabricación está listo para el consumo. Los quesos deben estar exentos de sustancias tales como grasas y proteínas de origen vegetal o animal diferente de las lácteas excepto las que provengan de los ingredientes utilizados y estos no deben exceder los límites máximos de plaguicidas, ni los de residuos de drogas o medicamentos veterinarios establecidos por el Codex Alimentarius. Por otra parte, esta norma específica los requisitos microbiológicos que debe presentar esta matriz alimentaria

3.2.1 Requisitos microbiológicos

Tabla 3: Requisitos microbiológicos para el queso fresco.

Requisitos	n	m	M	C
Exámenes de rutina:				
Coliformes, UFC/g (30°C)	3	1000	5000	1
Coliformes, UFC/g (45°C)	3	50	100	1
Recuento de mohos y levaduras, UFC/g	3	500	5000	1
Exámenes especiales:				
Recuento de <i>Staphylococcus coagulasa</i> +, UFC/g	3	100	1000	1
Detección de <i>Salmonella</i> / 25g	3	0	-	1
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> / 25g	3	0	-	1

Donde:

n: número de muestras por examinar.

m: Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M: Índice máximo permisible para identificar nivel de calidad aceptable.

c: Número máximo de muestras permisibles con resultados entre m y M. (6)

3.3 Microbiología del microorganismo

3.3.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) presentan ciertas características diversas a las demás bacterias como cualquier otro microorganismo, no obstante, este género ha sido empleado para diversos procesos industriales, desde la fermentación en lácteos, hasta la identificación en matrices cárnicas, convirtiéndolas en un consorcio interesante para algunas investigaciones basadas en biotecnología y calidad de alimentos. Las BAL son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria por su capacidad de conferir diferentes características sensoriales como textura, sabor y olor agradable a los alimentos fermentados incluyéndolas como cultivos iniciadores (1)(7). Por otro lado, las BAL son consideradas: generalmente reconocida como segura (GRAS por sus siglas en inglés) por presentar una importancia en la preservación y fermentación de algunos alimentos, mejorando las condiciones del producto, incluyendo la inhibición de los patógenos (8).

Dentro de sus generalidades, las BAL son productoras de una molécula de gran interés para la comunidad científica, se trata de los péptidos antimicrobianos denominados bacteriocinas, las cuales son un grupo de gran proporción que inhiben el crecimiento de algunos microorganismos, del mismo modo, se ha descrito en algunas investigaciones que las BAL manifiestan muchas otras moléculas relacionadas a esta capacidad para inhibir el crecimiento microbiano (9).

3.3.2 Taxonomía, morfología y generalidades bioquímicas

Estas son bacterias Gram positivas de diversas formas, desde cocos hasta bacilos con un grosor que va de 0.5 - 0.8 μm , no son formadoras de esporas y producen ácido láctico siendo el producto final de la fermentación de los azúcares (10) carecen de citocromo catalasa por lo que la respiración es omisa, convirtiéndolas en anaerobias facultativas, sin embargo, algunas especies de este grupo son catalasa positivas. Presentan un grupo hemina y pueden presentar colonias en medios de cultivo a pesar de su metabolismo anaerobio; son conocidos como microorganismos sensibles donde factores como la temperatura y requerimientos nutricionales, afectan directamente el crecimiento y reproducción de estas bacterias; para su crecimiento, necesitan de aminoácidos y vitaminas del grupo B como lo son lactoflavina, tiamina, biotina, ácido nicótico, ácido pantoténico y ácido fólico. Las bacterias ácido lácticas

son consideradas como microorganismos inmóviles y pueden desarrollarse en pH bajos, es decir, son tolerantes a condiciones ácidas (11)

Este grupo presenta 20 géneros, dentro de las principales están: *Lactococcus*, *Lactobacillus* (siendo este el grupo más grande), *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactosphaera*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (12). La relación que presentan estas especies es en comparación a la secuencia del rRNA 16S, con un valor de porcentaje molar guanina-citosina bajo; se ha encontrado que *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* y *Lactosphaera* son los géneros más cercanos genéticamente, *Lactococcus* y *Streptococcus* son relativamente cercanos a estos; *Lactobacillus* son los más diversos cuando se hace una relación filogenética; los géneros *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* son los más alejados de este grupo (13).

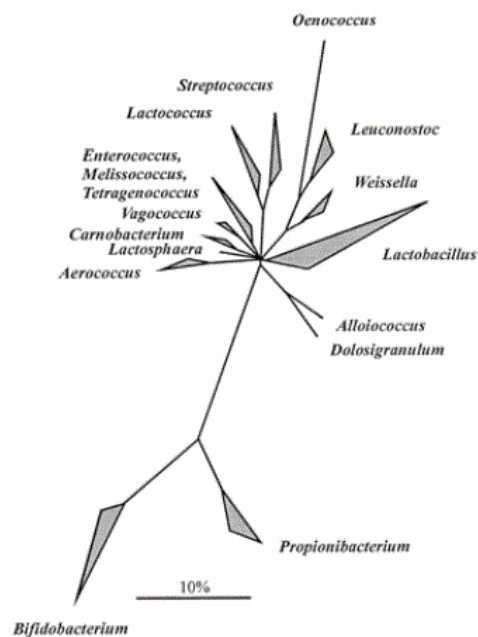


Figura 1: Árbol filogenético de bacterias ácido lácticas, imagen tomada de (7)

3.3.3 Estrés a temperaturas altas y bajas

Cuando las BAL se encuentran en condiciones térmicas altas, hay un desnaturalización proteica, afección en la membrana y ácido nucleico, considerados como principales lesiones por calor; inclusive, el estrés por calor impide, de alguna manera, el gradiente de protones de la membrana induciendo a una disminución en el pH intracelular.

Por otra parte, cuando estas bacterias son sometidas a una temperatura baja, ocurre una reducción en el flujo de membrana, cambios en el superenrollamiento del DNA y la formación de estructuras secundarias estables en las moléculas del DNA y RNA impidiendo que se den los procesos de replicación, transcripción y traducción (14).

3.3.4 Metabolismo de carbohidratos

En el metabolismo se encuentra la ruta más importante para estas bacterias que es la del ácido láctico al ser una característica heterofermentativa, sin embargo, algunas especies presentan un metabolismo homofermentativo y heterofermentativo facultativo. (Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria), las BAL heterofermentativas producen un total de ácido láctico del 50% y también producen pequeñas cantidades de etanol, aldehídos y dióxido de carbono; presentan la enzima fosfoctolasa, siguiendo las vías de monofosfato de hexosa o la vía de las pentosas; dentro del grupo de las BAL las especies que presentan un metabolismo heterofermentativo son las de *Leuconostoc*, incluyendo también algunos *Lactobacillus*, para estas especies se les dificulta tener presente fructosa difosfato, por lo que la fructosa-difosfato-aldosa está ausente para ellas (14)(11).

Las heterofermentativas facultativas, emplean la vía EMP o la vía de las pentosas, generando productos de ácido láctico, ácido acético y etanol.

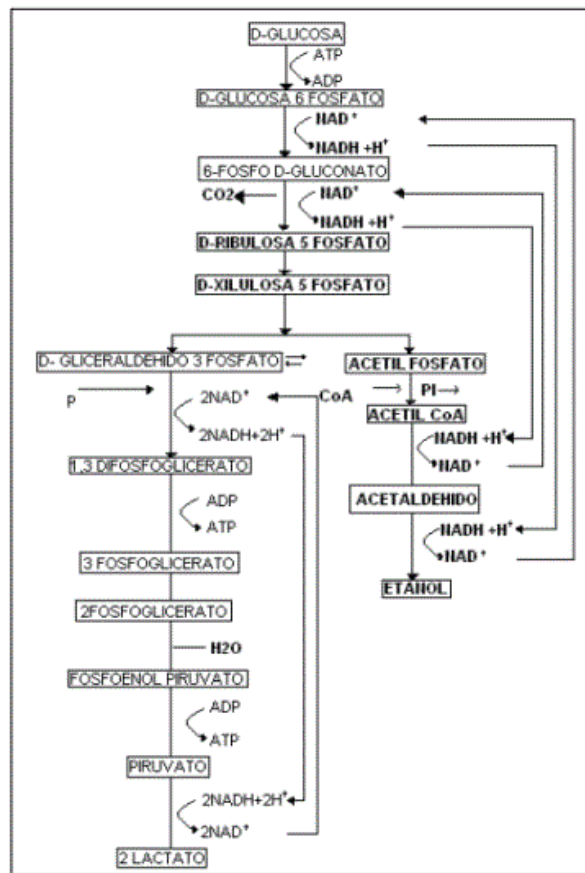


Figura 2: Vía heterofermentativa de bacterias ácido lácticas, fermentación heteroláctica (11)

Para los microorganismos que presentan un metabolismo homofermentativo, se les encuentra que producen un total de ácido láctico entre el 90 y 97% a partir de lactosa, siendo este un disacárido de glucosa y galactosa y es el azúcar más importante y abundante en la leche, el metabolismo de la lactosa se da por medio de una sistema enzimático. Las BAL

homofermentativas, presentan enzimas aldosa y hexosa isomerasa; utilizan la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) produciendo 2 moléculas de lactato por molécula de glucosa consumida. Las especies de este grupo son los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus*, incluyendo también algunas especies de *Lactobacillus* (14)(11).

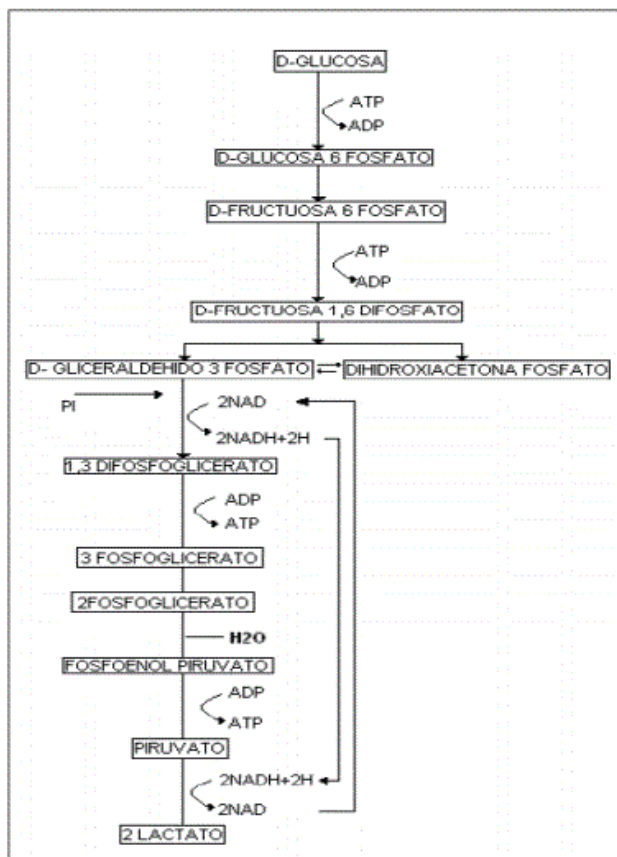


Figura 3: Vía homofermentativa de bacterias ácido lácticas, fermentación láctica (11)

3.3.5 Metabolismo de Nitrógeno

Se menciona en artículos dedicados al estudio de las características bioquímicas de las bacterias ácido-lácticas, que estas dependen de sistemas proteolíticos para la degradación de proteínas, estos sistemas consisten principalmente de serin-proteinasa localizada en la zona extracelular, sistemas de transporte específicos para péptidos di-tri y oligopéptidos (mayores a tres residuos de amino ácidos), finalmente también debe tener una gran cantidad de peptidasas intracelulares; dentro de los procesos de fermentación, el proceso de la proteólisis incrementa la concentración de amino ácidos. El efecto de acidificación por el uso de las proteinasas, las cuales deben estar en un pH óptimo entre 3.0 - 4.0, es considerado como un factor importante para procesos de proteólisis, especialmente en fermentaciones que conllevan largos periodos (11)(10).

3.3.6 Capacidad antimicrobiana

En 1877 Pasteur y Joubert observaron las primeras características antimicrobianas con posibilidades terapéuticas, tiempo después, Rogers, 1928, logro identificar una sustancia de característica peptídica, actualmente conocida como nisina, producida por *S. lactis*, inhibiendo microorganismos Gram positivos incluyendo patógenos de alimentos (15).

La capacidad de producir extenuantes cantidades de ácido láctico y acético por fermentación en carbohidratos y la disminución de pH, son principales factores en las que se encuentran cimentado la actividad antagonista de las BAL (16); los ácidos lipofílicos tienen la capacidad de atravesar la membrana plasmática interfiriendo directamente el metabolismo celular, disminuyendo el pH interior de la célula; este efecto no es posible en organismos acidodúricos tales como hongos, levaduras y bacterias ácido lácticas.

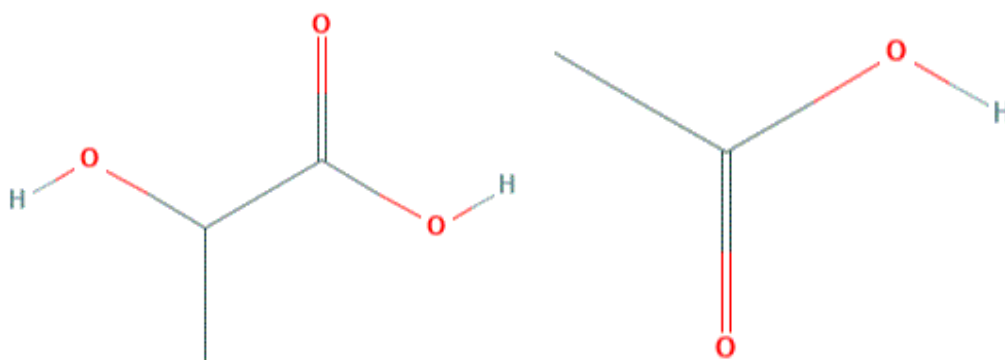


Figura 4: representación molecular del ácido láctico (izquierda) y el ácido acético (derecha); imagen tomada de PubChem de NCBI.

La producción de ácidos no es la única característica que inhibe el crecimiento de otras bacterias; la generación de Peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y Dióxido de carbono (CO₂), compuestos aromáticos como el diacetilo y acetaldehído, derivados deshidratados del glicerol, benzoato, enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y antibióticos (17), también son conocidos como principales factores antimicrobianos (18).

No obstante, para muchos investigadores ha sido de gran interés el uso de bacteriocinas como agentes antagonistas, algunas de las ventajas que se han considerado para la aplicación y uso de las bacteriocinas son su no toxicidad para células eucariotas (19). Además, su aplicación no solo se enfoca como bioconservador de alimentos, sino también en cosméticos y en tratamientos biomédicos contra infecciones en medicina humana y veterinaria (20). Las bacteriocinas son péptidos con capacidad inhibitoria producidos por una síntesis ribosomal y son conocidas por ser un grupo diverso, que han sido encontradas en numerosas especies de bacterias (generalmente ácido lácticas), incluyendo también un cúmulo de funciones tales como las características bioquímicas, estructura primaria, determinantes genéticos, número de microorganismos inhibidos, modo de acción, zona de producción, entre otras (21)(22).

Tabla 4: Clasificación de las bacteriocinas.

Clasificación	Características	Subcategoría	Ejemplo
Clase I	Péptidos que contienen aminoácidos modificados (lantionina, β -lantioninato)	-Tipo A (moléculas lineales)	-Nisina, subtilina, epidermina (lantibióticos)
		-Tipo B (moléculas globulares)	-Mersacidina
Clase II	-Clase heterogénea de péptidos termoestables pequeños	-Subcl IIa (pediocina-antilisteria)	-Pediocina, enterocina, sakacina.
		-Subcl IIb (compuesto 2 péptidos)	-Plantaricina, lacticina F.
		-Subcl IIc (otras bacteriocinas)	-Lactococcina
	-Grupo de péptidos lineales.	-Subcl IId	-Lacticina Q.
	-Degradación de proteínas grandes	-Subcl IIe	-Propionicina F.
Clase II	-Péptidos grandes termolábiles.		-Helveticina J, millericina B
Clase IV	-Péptidos cíclicos*		-Reutericina 6.
Clase V	-Péptidos de estructura circular		-Enterocina AS-48, gaseiricina.

*Asociados con lípidos o carbohidratos

Tabla adaptada de (Heredia-Castro et al., 2017) (20)

Las bacteriocinas de las BAL contienen residuos de aminoácidos tales como lisina, arginina e histidina, los cuales les confieren un carácter catiónico (pH neutro), y también contienen residuos de alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano, lo que les proporciona su naturaleza hidrofóbica. (20)

Tabla 5: Características generales de las bacteriocinas

Origen	-Origen ribosomal: péptidos extracelulares producidos por bacterias Gram positivos y Gram negativas. -Se estima que el 99% de las bacterias son capaces de sintetizar cuando menos una bacteriocina.
Efectos	- <i>In vitro</i> : No tóxica para líneas celulares normales, tóxicas para células cancerosas. - <i>In vivo</i> : No estimula el sistema inmune, no tóxico en modelos animales y humanos (se inactivan por proteasas digestivas).
Espectro de acción	-Pueden actuar contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. -Algunas bacterias patógenas susceptibles son <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>Pseudomonas</i> spp, <i>E. faecalis</i> , <i>Salmonella</i> spp.
Modo de actividad	-Bactericida, bacteriostático y fungicida.
Mecanismo de acción	-Permeabilización de la membrana (pérdida del potencial de membrana, consumo de reservas energéticas celulares, disminución de la síntesis de DNA, RNA y proteína). -Lisis celular
Estructura química	-Péptidos, glicoproteínas y lipoproteínas.
Peso molecular	-Gram negativas: son de tamaño muy variable y pueden alcanzar hasta los 80 kDa. -Gram positivas: por lo general su tamaño es menor a los 10 kDa, aunque se han reportado valores más altos. -Archea: su tamaño puede llegar a alcanzar aproximadamente los 20kDa.
Carácter	-Hidrofóbico. -Anfipático.
pI *	-De 8.1 a 10.0
Sensibilidad a enzimas	-Todas son sensibles a las enzimas proteolíticas tales como la pepsina, tripsina y pronasa.
Sensibilidad a temperaturas	-Compuestos termoestables; la mayoría soporta 100-121°C durante 15-30 min.
Sensibilidad a pH	-La mayoría de las bacteriocinas son estables en el intervalo de pH de 3.0 a 9.0

*pI: punto Isoeléctrico

Adapada de (Heredia-Castro et al., 2017) (20)

3.4 Prueba de sensibilidad microbiana

Las pruebas de sensibilidad o antibiogramas determinan la susceptibilidad de un microorganismo frente a sustancias antimicrobianas, que van desde biomoléculas hasta productos químicos como los fármacos, esta susceptibilidad se presenta a partir de la exposición de una concentración estandarizada del patógeno a estas sustancias. Las pruebas de sensibilidad pueden hacerse para bacterias, hongos o virus. Para algunos microorganismos, los resultados obtenidos permiten predecir que se obtendrá con sustancias similares; así, no todos los medicamentos potencialmente útiles necesitan probarse (23).

Las pruebas de sensibilidad se realizan *in vitro* y no tienen en cuenta numerosos factores que afectan *in vivo* (la farmacodinámica y la farmacocinética, las concentraciones del medicamento en el sitio de acción, el estado inmunitario del huésped, las defensas específicas de sitio). Las pruebas de sensibilidad no siempre predicen los resultados de la terapia; estas pruebas pueden ser cualitativas, semicuantitativas o con métodos basados en los ácidos nucleicos. Las pruebas también pueden determinar el efecto de la combinación de distintos antimicrobianos (24).

3.5 Microorganismos patógenos asociados a quesos frescos.

Aunque existe un número considerable de informes con respecto a la seguridad microbiológica del queso de leche cruda, este problema es todavía controversial. En general, los quesos frescos se consideran microbiológicamente inseguros debido a la presencia de patógenos ya sea en la materia prima, en leche cruda o a la contaminación durante el proceso de manufacturación del queso tradicional.

Desde la elaboración del queso a partir de la leche cruda sin ningún tratamiento previo, el número y tipos de microorganismos presentes en esta materia prima dependen de factores como: la alimentación de los animales, el saneamiento general en la planta de fabricación, la calidad del agua para lavar los utensilios, las condiciones de manipulación, la temperatura y el tiempo de almacenamiento del queso (25).

Los patógenos reportados con mayor frecuencia han sido *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* y *Brucella* spp., entre otros. En países como Venezuela, México, Colombia y Brasil predominan *Leuconostoc mesenteroides*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Lactobacillus casei*, y los géneros *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Lactococcus* (26).

En América Latina se reportaron 719 brotes entre los años 1993 y 2002, y *Staphylococcus aureus* fue el agente causante implicado, debido a infecciones estafilocócicas que afectaron a 27 693 personas de las cuales tres fallecieron; 48 de estos brotes tuvieron lugar en Venezuela, y en 40 de ellos, el queso fue el alimento involucrado.

Durante el año 2011, en el Golfo de México se detectó la presencia de microorganismos patógenos en 52 muestras de queso fresco, *S. aureus* fue el agente más frecuente (36 %), *Brucella abortus* (11 %), seguido de *Salmonella* spp. (4 %) y *Listeria monocytogenes* (2

%).65 En comparación con los datos anteriores, un estudio realizado en el año 2014 no registra la presencia de *Brucella* spp. ni *Salmonella* spp., pero sí la presencia de microorganismos patógenos como *Escherichia coli* en el 100 % de las muestras analizadas (2).

3.6 *E. coli* como patógeno en quesos - interés en salud pública

Una amplia variedad de alimentos ha sido involucrada como vehículos de este patógeno, entre los cuales, los derivados lácteos han jugado un rol importante. Brotes por consumo de leche no pasteurizada, yogur y quesos han sido reportados y están ampliamente descritos en la literatura (1, 4). En cuanto a los quesos, dado el potencial de transmisión que tienen, se han desarrollado investigaciones destinadas a aportar información que permita predecir el comportamiento y supervivencia de *Escherichia coli* O157:H7 en este tipo de alimento. Los resultados denotan que su viabilidad está condicionada por varios factores, entre ellos, actividad de agua (aw), pH, flora bacteriana y fúngica asociada, maduración, temperatura de almacenamiento, número de células del patógeno y el proceso de manufactura, entre otros, esto significa que el comportamiento del patógeno, según el tipo de queso, es variado; por ejemplo, en queso tipo mozzarella se demostró supervivencia del microorganismo si la temperatura de cuajado e hilado está por debajo de 70°C. En quesos artesanales de consumo masivo, en India, hallaron que *E. coli* O157:H7 sobrevive durante la manufactura y el almacenamiento. Así mismo, ensayos realizados por Lekkas y col. Demostraron la supervivencia de este serotipo inoculado en bajas dosis (100 y 500 células/g) en quesos tipo Galotyri (Grecia) (2). *Escherichia coli* es un microorganismo que se encuentra comúnmente en la flora intestinal del hombre y de los animales, y su presencia en los alimentos indica contaminación fecal. En los EE. UU. se estima que las infecciones por queso fresco con *Escherichia coli* O157:H7 son responsables de por lo menos 20 000 casos de enfermedad y 250 muertes por año.

3.7 Aplicaciones biotecnológicas de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas han sido utilizadas por muchos años como conservantes en la industria de alimentos, ya que promueven la producción de sustancias antimicrobianas como el ácido láctico, el etanol, el dióxido de carbono, el benzoato y bacteriocinas; los péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) se han utilizado como bioconservantes en alimentos desde la década de los 80's, ya que contribuyen favorablemente en la preservación de éstos por su capacidad para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos o alterantes presentes en las materias primas y que podrían convertirse en la flora predominante de algunos productos fermentados. El desarrollo de estos microorganismos ácido lácticos, y la ausencia de patógenos o alterantes, contribuyen favorablemente en la preservación de los alimentos permitiendo reducir el uso de conservantes químicos y suavizar los tratamientos a los que se someten los alimentos procesados sin que esto afecte su calidad y seguridad (27).

El microorganismo antagonista presenta algunas características específicas siendo las más importantes: su estabilidad genética, efectividad a bajas concentraciones, no exigente en requerimientos nutricionales, capacidad de sobrevivir a las condiciones adversas del medio ambiente, efectividad para un amplio rango de microorganismos patógenos en una variedad de productos, capacidad de reproducirse en medios de crecimiento económicos, que se mantenga en una formulación durante un largo período de vida, que sea fácil de aplicar sin producción de metabolitos secundarios que causen daños a la salud humana, resistente a los fungicidas y compatible con los procedimientos comerciales y no patogénico sobre el hospedero (28). Es importante comprender el mecanismo de acción de los antagonistas para un mejor uso de estos, y para la selección de nuevos microorganismos antagonistas efectivos. Hasta ahora, los conocimientos sobre los mecanismos de acción involucran: la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por los nutrientes y espacio e inducción de resistencia. Cabe destacar que en general más de un mecanismo puede estar implicado en el efecto de biocontrol (29).

3.8 Caracterización de microorganismos

Para la correcta identificación del consorcio microbiano presente en un tipo de muestra determinado, se ha acudido al análisis molecular donde se utiliza primordialmente la amplificación por reacción de cadena de la polimerasa del gen ARN ribosomal (ARNr) 16S, las características de este gen son: longitud de 1500 pares de bases, se encuentra formado por un total de nueve regiones variables y se intercalan con regiones conservadas, es utilizado generalmente para la caracterización filogenética de bacterias que constituyen un consorcio en diferentes muestras (30). se describe que es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs*; la estructura de esta molécula puede prevalecer por periodos de tiempo extensos y debido a su función, los cambios en la secuencia van relacionados a un cambio aleatorio; la variabilidad que presenta el ARNr 16S, permite tener una diferenciación más concreta de microorganismos que puedan estar alejados de su origen al igual que los más cercanos, permitiendo especificar entre especies, variedades y cepas existentes; dentro del espectro de identificación microbiana, influye también su tamaño disminuyendo en una gran proporción las variables que se presentan cuando se comparan más de dos secuencias (31). Esta molécula es considerada por la comunidad científica como un marcador molecular para los estudios dirigidos a un hallazgo taxonómico y evolutivo de una especie, al ser considerado un marcador universal, el ARN ribosomal 16S, puede presentar también una alteración en la detección de varios microorganismos no cultivables (32).

Las secuencias empleadas de los genes de ARN ribosomal con subunidades, ha mejorado la forma de identificar relaciones moleculares entre especies microbianas; hoy en día, es la base de la descripción de bacterias incluyendo Archeas (31); por otra parte, se ha manifestado la catalogación comparativa del ARNr 16S donde presenta las siguientes ventajas, en primera instancia: el procedimiento puede ser aplicado para cualquier género, induciendo la similitud de los que son comparables, esto permite la definición cuantitativa de la especie, género y familia del microorganismo, integrando la diversidad del organismo. Segundo: la diversidad

debe ser detectable por tiempo de antigüedad, ayudando a la identificación de las posibles relaciones presentes entre las bacterias (33).

Los marcadores moleculares de identificación taxonómica, deberá cumplir con algunas características donde se especifica que la región de ADN debe contener una variabilidad y una diversidad significativa por especie en su genética, esta región debe tener una longitud pertinente para la extracción y secuenciación de forma fácil, y debe presentar unos sitios conservados que ayuden en el desarrollo de un diseño universal de primers para el uso en la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (34)(35).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue diseñada en el año 1983 por Mullis, y su principio se basa en la utilización del ADN polimerasa, reconocida como una enzima capaz de generar numerosas copias de ADN, utilizando ciclos de amplificación, cada ciclo consta de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión (36).

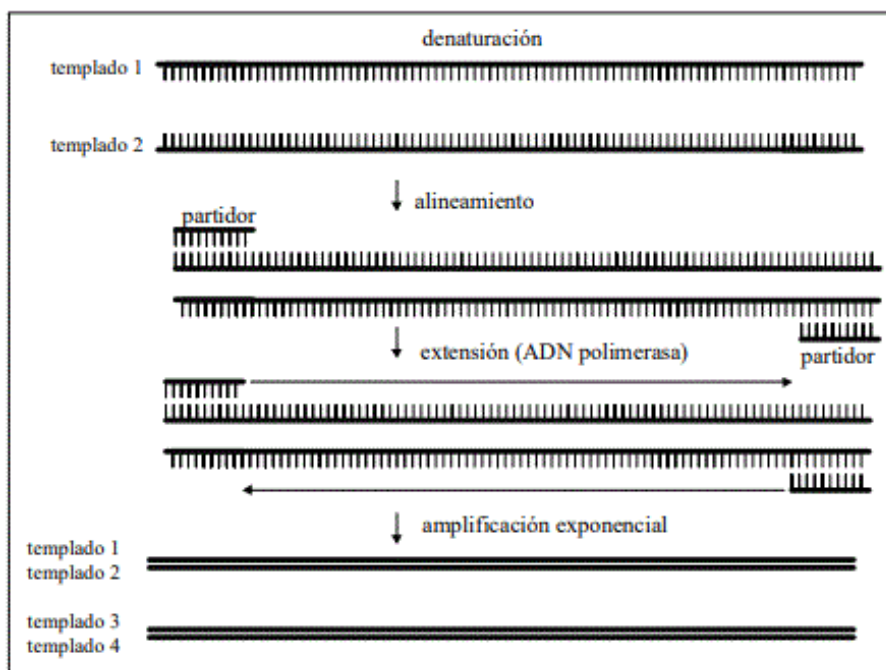


Figura 5: Esquematación del proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional (37).

En la desnaturalización ocurre la separación de la molécula de ADN por la temperatura alta, obteniendo una cadena de la molécula empleándose como molde para el continuo proceso de amplificación, seguido a esto, hay una disminución de la temperatura permitiendo el alineamiento o la hibridación, en este proceso los primers o iniciadores se unen de forma específica a la secuencia que se desea amplificar, la característica principal de los primers es determinar la ubicación única del inicio y fin del fragmento de la secuencia de ADN que se amplificará, estos oligonucleótidos deben cumplir con determinadas características para el uso en la PCR, dentro de las cuales se incluye la longitud de ácidos nucleicos del primer, la cual se encuentra usualmente en un tamaño entre 10 y 30 nucleótidos, el T_m (temperature of

melting, en inglés) Asociado a la cantidad de GC presente en la secuencia del primer, formación de estructuras secundarias o Hairpin y estabilidad; los primers se diseñan por síntesis química y por complemento, logrando obtener fragmentos que se unen en los extremos 5'-3' de la cadena de ADN. Cuando los primers se encuentran adheridos a la secuencia, ocurre un aumento en el proceso para la fase de extensión donde la enzima ADN polimerasa une nucleótidos libres complementando una nueva cadena de ADN del gen o fragmento de interés; el ADN polimerasa empleada en las PCR usualmente es obtenida de *Thermus aquaticus*, una bacterias extremófila capaz de habitar en ambientes con temperaturas sobre los 100°C; la Taq polimerasa o ADN polimerasa tiene la capacidad de generar nuevas cadenas de ADN a temperaturas alrededor de los 100°C, permitiendo la desnaturalización de proteínas que puedan ser interferencia al momento de obtener un ADN puro; se ha calculado en otras investigaciones que la Taq polimerasa puede incorporar 60 nucleótidos por segundo a una temperatura de 70°C. Los ciclos empleados en la PCR permiten que haya un mayor número de copias en las fases de alineamiento y extensión, esto permite entender que en cada ciclo se produce un número de copias que puede ser equivalente a la cantidad de hebras de ADN templado, donde una molécula de ADN de doble hebra al pasar por los 30 ciclos de amplificación se podrá obtener 2^{30} copias del fragmento de ADN (37).

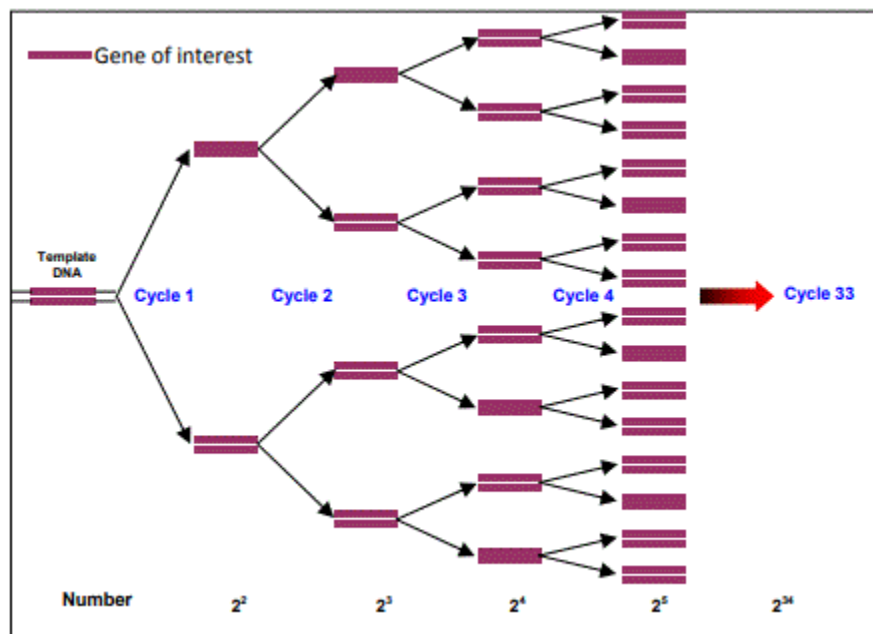


Figura 6: Interpretación de ciclos de amplificación en el proceso de la PCR con el número de copias del gen de interés (36)

Para la caracterización de poblaciones microbianas, se ha implementado la secuenciación del ADN lo cual determina el orden nucleotídico que presenta un fragmento de ADN logrando identificar hasta géneros y especies (38). La secuenciación es un proceso exacto pero con dificultades al inicio y final del proceso; para la secuenciación de ADN se encuentran establecidos diversos métodos, uno de los más empleados es el método de Sanger, también conocido como método didesoxi, desarrollándose como una técnica enzimática permitiendo la determinación de una secuencia, donde se utiliza un cebador para el inicio de la síntesis, desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), y el ADN polimerasa; los fragmentos amplificados son generados hasta la incorporación de un ddNTP señalando el final de la reacción; estos fragmentos son separados por una electroforesis en gel de poliacrilamida, donde se observa el orden de un solo nucleótido y no la longitud de la molécula como una electroforesis convencional, este barrido de nucleótidos define el orden en que se encuentran dentro de la molécula. Actualmente se han empleado procesos de secuenciación de siguiente generación, permitiendo la eficiencia en el proceso y la obtención de resultados más rápidos, sin embargo, para este método se debe tener en cuenta el tamaño que se va a secuenciar (39)(40).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificación de la inhibición del crecimiento de *E. coli* por la presencia de bacterias ácido lácticas.

4.2 Objetivos específicos

- Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas provenientes de un queso fresco de la región cafetera.
- Evaluar la capacidad de inhibición en *E. coli* de las BAL aisladas del queso fresco.
- Caracterizar el género de bacterias ácido lácticas inhibitorias de *E. coli* por secuenciación 16s rRNA.
- Aplicación de bacterias ácido lácticas en una matriz para posteriormente adicionarlas en un queso fresco por ensayo *in vivo*.

5 METODOLOGÍA

5.1 Obtención de quesos frescos

Los quesos fueron obtenidos en una quesera distribuidos de la finca Santa Rita ubicada en una vereda de Santa Rosa de Cabal, municipio del Departamento de Risaralda, los quesos fueron llevados con condiciones controladas a una temperatura manteniendo la cadena de frío en una hielera con geles refrigerantes, el almacenamiento de estos quesos fue con una temperatura de -20°C hasta -80°C para evitar su deterioro en el laboratorio de la Universidad Libre seccional Pereira; la evaluación de presencia de bacterias ácido lácticas fue 2 semanas después de su adquisición.

5.2 Obtención de bacterias ácido lácticas provenientes del queso

El aislamiento de las bacterias ácido lácticas se dio en el medio Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar) (5), el proceso inicia con el descongelamiento del queso a temperatura ambiente (RT), después se toman 10 gramos del queso y se adicionan a 90 ml de agua peptona con tween, posteriormente se adiciona 1 mL de la homogenización en el medio de cultivo. Las colonias presuntivas se siembran en agar MRS con azul de anilina al 0.2% para la confirmación de bacterias ácido lácticas (41). El almacenamiento de las cepas positivas fue por Cryobank para su uso durante el desarrollo del proyecto; las cepas en Cryobank fueron almacenadas en el cepario de bacterias de la Universidad Libre seccional Pereira.

5.3 Activación de *E. coli* ATCC 25922 y *Lactococcus lactis* ATCC 11454

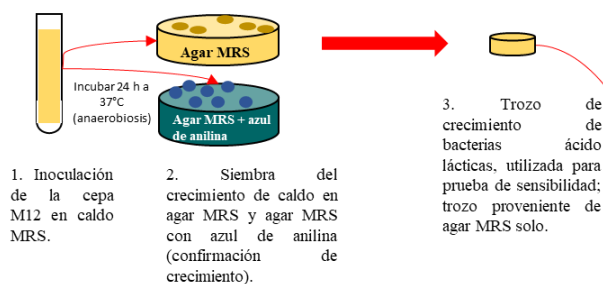
La cepa *E. coli* es un material de referencia certificado (MRC) el cual viene en presentación Kwik-Stik, esta fue aislada en el medio Brain Heart Infusion agar (BHI agar), Las condiciones de incubación son a una temperatura de $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un tiempo de $24 \pm 3\text{h}$. las cepas Kwik-Stik, son procedentes del banco de cepas de la Universidad Libre seccional Pereira.

Después del crecimiento en un medio nutritivo, se inoculó en agar EMB para confirmar la pureza de *E. coli*, las condiciones de incubación: temperatura de $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un tiempo de $24 \pm 3\text{h}$. los crecimientos confirmados para *E. coli* fueron almacenados en Cryobank.

Se activó una cepa para el control positivo la cual fue *Lactococcus lactis*, la activación fue en agar MRS, siguiendo el procedimiento de Kwik-Stik, las condiciones de incubación fueron a 37°C por $24 \pm 3\text{h}$. los crecimientos confirmados son almacenados en Cryobank en el cepario de la Universidad Libre seccional Pereira.

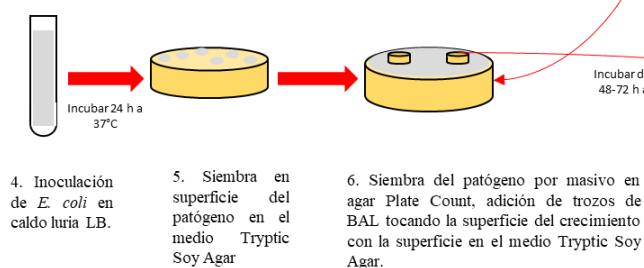
5.4 Prueba de antagonismo

A. Detección y aislamiento de bacterias ácido lácticas*



* Este procedimiento también fue implementado con *Lactococcus lactis* como control positivo de bacterias ácido lácticas

B. Activación de patógeno y prueba de antagonismo



C. Interpretación de prueba de antagonismo

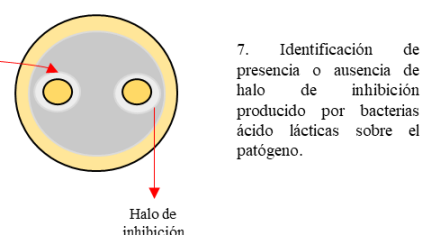


Figura 7: Protocolo para prueba de antagonismo diseñado por los estudiantes, basándose en el protocolo del artículo:

En los caldos MRS y Luria LB, se adicionaba una perla del banco Cryobank correspondiente a cada microorganismo mientras que para la siembra en los medios de cultivo se tomaba 1 mL del caldo inoculado y se hacía un siembra masiva cubriendo completamente la caja.

5.5 Caracterización molecular de bacterias ácido lácticas

5.5.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se ejecutó por 3 Kits de diferentes casas comerciales. El primer método implementado es el de QuickExtract™, generado por Epicentre Biotechnologies®; esta es una técnica, que especificada en su nombre, es de rápida ejecución, sin embargo, no asegura una pureza total cuando se obtiene el pellet.

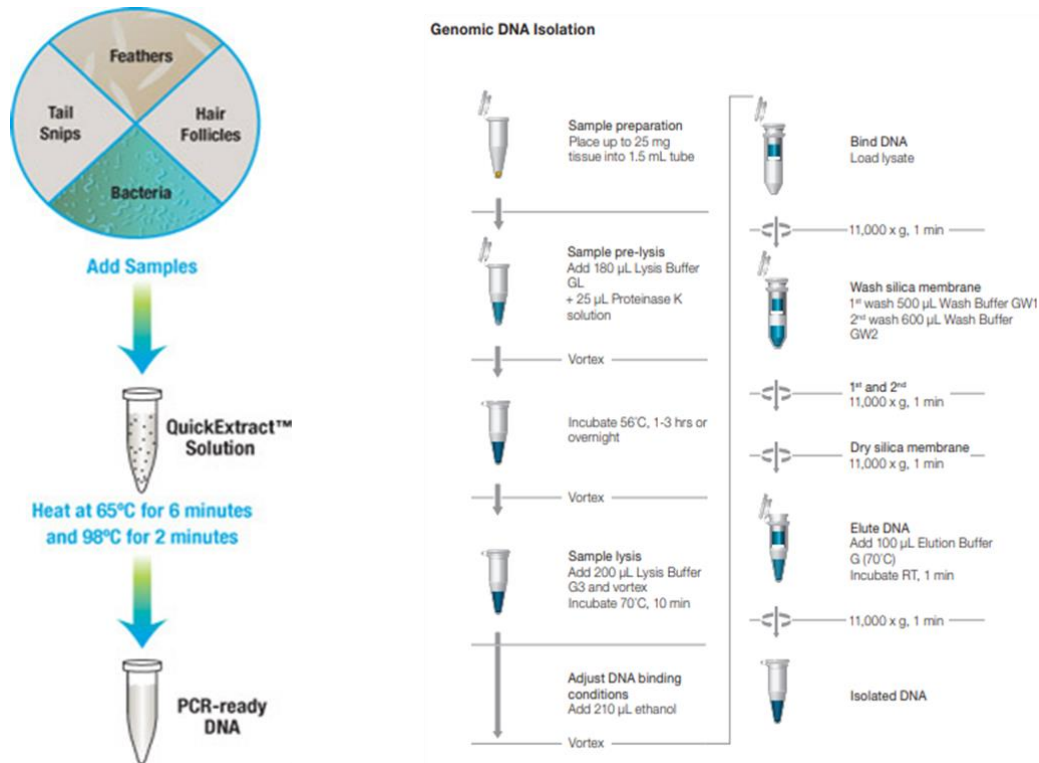


Figura 8: Protocolo de extracción de ADN, lado izquierdo dado por Ecogen, QuickExtract™ DNA Extraction Solution (42); lado derecho dado por Bioline, Kit de extracción Isolate II (43).

El segundo método de extracción fue por el Kit de Bioline donde antes de emplear el protocolo del kit de extracción ISOLATE II se debe disolver proteínasa K la cual es estable a -20°C , preparar el buffer GW2 adicionándole etanol al 96% y precalentar el buffer de elución G a 70°C .

Para las muestras bacterianas se debe hacer una preparación donde se toma 1 mL del cultivo bacteriano y centrifugarlo por 5 minutos a 8.000 rpm, remover el sobrenadante, seguidamente se continua con el proceso de pre-lisis.

Para el ajuste de ADN se utilizó etanol al 96%; para la elución del ADN se agregó primero 50 µL del buffer de elución G, se centrifugó y después se agregaron otros 50 µL, completando los 100 µL que se deben agregar; se centrifugó, se removió el sobrenadante y se almacenó el pellet a -20°C como lo pide la casa comercial.

Para el kit de extracción RTP® Bacteria DNA mini kit de Stratec Molecular, la muestra de cultivo bacteriano debe estar con menor tiempo de incubación (18 horas) para ser usado. La muestra se centrifuga por 5 minutos a 8.000 rpm, el sobrenadante se desecha dejando únicamente el pellet.

Scheme of the RTP[®] Bacteria DNA Mini Kit

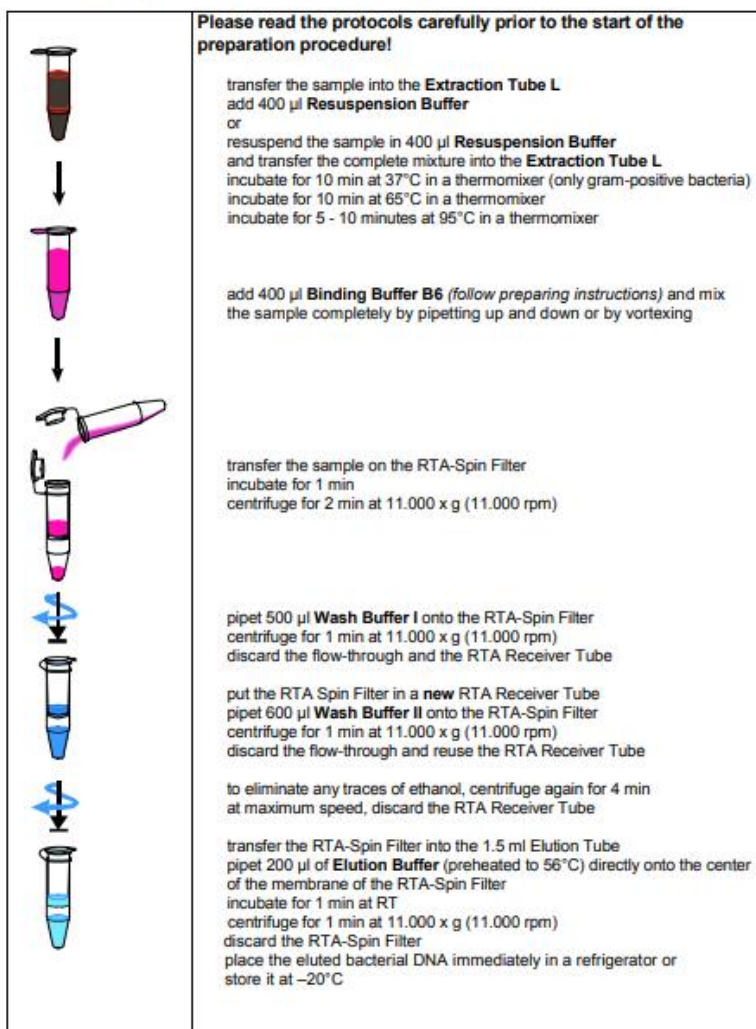


Figura 9: Protocolo de extracción de ADN dado por el manual de uso RTP[®] Bacteria DNA Mini Kit, Stratec Molecular.

5.5.2 Cuantificación de ADN

Para la cuantificación se empleó el espectrofotómetro MultiSkan GO de Thermo Scientific[™], donde se aplicaba 2 μ l de la muestra de extracción de ADN y 2 μ l de agua desionizada como blanco en la placa μ DROP[™]; se analizó por duplicado, midiendo la absorbancia entre 260 y 280 nm, a una velocidad de lectura de 6 segundos, al igual que una velocidad de barrido espectral de 10s, parámetros adheridos por defecto al equipo y software; cada resultado es visualizado y leído en el programa SkanIt, siendo el software designado para el equipo.

5.5.3 Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) para amplificación del gen 16s rRNA

Los cebadores utilizados para la detección molecular de las bacterias ácido-lácticas fueron:

Tabla 6: Primers seleccionados para la amplificación del gen 16s rRNA

Gen	Cebador	Secuencia	Especificaciones
16s RNAr	16s RNAr Forward	AGA GTT TGA TCC TGG CTC	Eurofins Genomics, Tm: 59.6°C
	16s RNAr Reverse	CGG GAA CGT ATT CAC CG	Eurofins Genomics, Tm: 57.6°C
<i>Secuencias tomadas de la tesis: aislamiento y selección de Lactobacillus sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas (7) y en la investigación Isolation and Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Using 16s rRNA Genes from Fermented Teff (Eragrostis tef (Zucc.)) Dough (44)</i>			

Para el desarrollo de la PCR se preparó el máster mix con los siguientes implementos y sus respectivas concentraciones

Tabla 7: Preparación del máster mix para PCR

Composición	1 tubo	Concentración final
2X Master Mix OneTaq® with Standard buffer (New England Biolabs® Inc.)	10 µL	1X
10µM 16sRNAr F	0.5 µL	0.25µM
10µM 16sRNAr R	0.5 µL	0.25 µM
H ₂ O desionizada	7 µL	-
DNA	2 µL	-
Volumen final	20 µL	-

Los ajustes en el termociclador para la PCR inician con la desnaturalización a una temperatura de 94°C por un tiempo de 5 minutos; la fase de alineación comenzó con una temperatura de 94°C por 1 minuto, pasando gradualmente a 55°C por 1 minuto finalizando esta fase en 72°C por 3 minutos, esta secuencia se realizó en 35 ciclos, finalizando la temperatura del último ciclo, sigue la fase de extensión con una temperatura de 72°C por 10 minutos; este proceso da como resultado un tiempo de PCR de 03 horas con 29 minutos; finalizando todo el proceso se almacenan las muestras a 4°C. protocolo tomado con cambio de (*Identificación molecular de probióticos Martines I, 2008*) (45)

5.5.4 Electroforesis

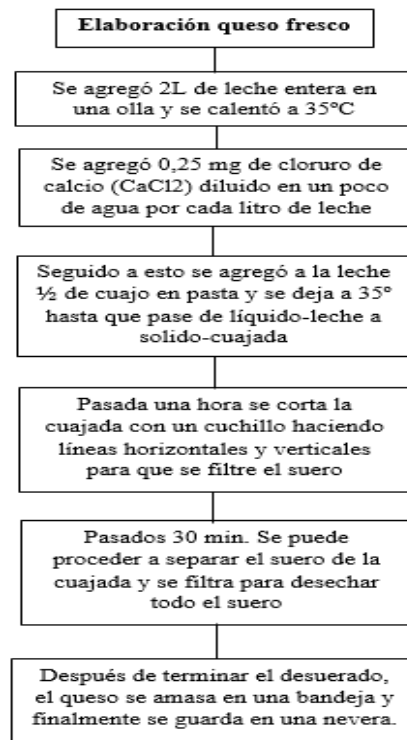
Para la electroforesis se preparó el buffer TBE partiendo del stock TBE (Tris-Boric acid-EDTA) [10X] de Fisher Brand. Para la preparación del gel agarosa al 1% se diluye con buffer TBE 1X, calentando hasta que esté completamente translucido, posteriormente antes de servirlo en la cámara de electroforesis, se le agregó el intercalante Midori Green Xtra de Nippon Genetics Europe. La carga en el gel de las muestras se realizó de la siguiente manera, 4 μ l de ADN, 2 μ l Buffer de carga 6X y 6 μ l de agua desionizada; finalmente para el marcador de peso molecular se preparó 1 μ l de marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (New England Biolabs® inc.), 2 μ l de buffer de carga 6X y 9 μ l de agua desionizada. El tiempo de corrida de electroforesis se definió por 1 hora con 10 minutos con un voltaje de 110 voltios (35).

5.5.5 Secuenciación

La secuenciación se realiza por la técnica de Sanger doble sentido para producto de PCR purificado; Producto de PCR (no purificado): Concentración: 100ng/ μ L, Volumen 20-30 μ L. El producto amplificado será enviado para secuenciar a la compañía Novogene.

5.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de la BAL sobre el Queso

5.6.1 Preparación queso fresco



5.6.2 Preparación de matriz para bacterias ácido lácticas

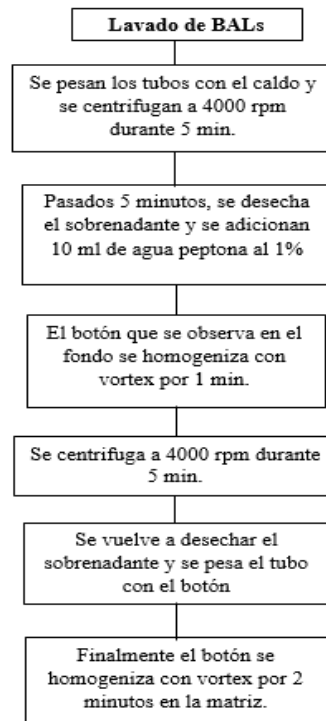
Para la elaboración de esta prueba de antagonismo se realizó una matriz con el objetivo de tener una inmovilización de las BALs. La composición de la matriz es:

Tabla 8: Composición de la matriz para ensayo *in vivo*.

Compuesto	Cantidad
Carboximetilcelulosa	0.5 g
Almidón	0.5 g
Goma Xanthan	0.5 g
Agua destilada	100 ml

una vez se pesen cada uno de los materiales se mezclan en un frasco tapa azul y se calientan con agitación hasta los 85°C durante 3 minutos para la gelatinización del almidón y para estabilizar la matriz. Como anteriormente ya se tenía una siembra de BALs en agar MRS se toma una muestra de estas y fueron sembradas en caldo MRS y llevadas a incubación por 48 horas a 37°C, posteriormente se lleva a cabo el lavado de las BALs para ser incorporadas a la matriz y así evitar residuos del medio de cultivo.

5.6.3 Lavado de BALs



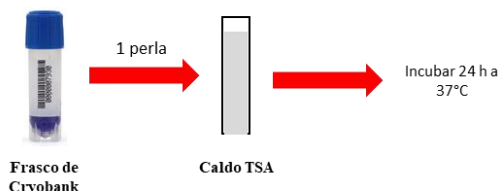
5.6.4 Inclusión de las BALs en el Queso Fresco.

Se realizó la inclusión de BALs a la matriz en el proceso de amasado del queso; se definió un peso de 200g de queso el cual fue inoculado de diferentes maneras para analizar los diferentes resultados.

5.6.5 Identificación de actividad antimicrobiana

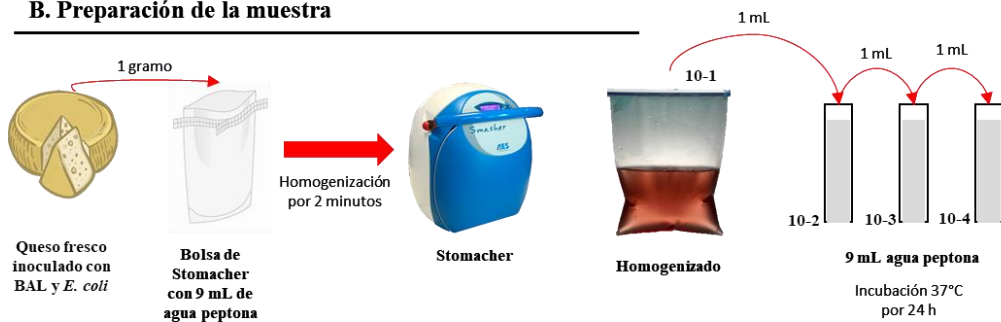
Se procede a verificar la actividad antimicrobiana de las cepas probadas frente el patógeno de interés identificado como *E. coli* el cual suele ser un contaminante habitual en este tipo de productos.

A. Activación de patógeno (*Escherichia coli*)



1. Preparación del patógeno en caldo TSA. se toma una perla de Cryobank y se adiciona en el caldo, posteriormente se somete a incubación .

B. Preparación de la muestra

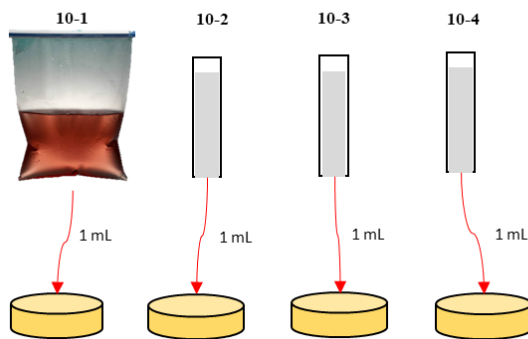


2. se pesa 10g de queso inoculado con BALs, se añaden a 90 ml de agua peptona al 1%(m/v).

3. Se homogeniza en el Stomacher por 2 minutos a velocidad lenta.

4. Se hace dilución hasta 10^{-4} , teniendo en cuenta que el homogenizado es 10^{-1} . Las diluciones se incuban.

C. Siembra e interpretación



5. De las diluciones se toma 1 mL y se hace siembra en profundidad, la incubación será por 72 horas a 37°C.



6. Pasado el tiempo de incubación se tendrá en cuenta las cajas que presenten entre 30 – 300 UFC

Figura 10: procedimiento de prueba de antagonismo *in vivo*.

Se podrá analizar los resultados comparando las muestras con el control que es la muestra con el mismo procedimiento usando queso sin adición de BALs, se podrá observar si se dio el proceso de inhibición que afectará el crecimiento del patógeno (*E. coli*) y el crecimiento que se observe en la caja estará por debajo de 30 ufc lo cual no será significativo.

5.7 Análisis estadístico

Se realizará un análisis estadístico para encontrar la diferencia significativa entre los halos de inhibición expresados por promedio \pm desviación estándar. Utilizando análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% ($P < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 Aislamiento y activación de la cepa M12, consorcio de bacterias ácido-lácticas.

Se evaluaron un total de 27 quesos de los cuales 3 manifestaron mejor obtención de BAL, estos fueron las muestras 11, 12, 14; de estas no se presenta registro fotográfico. La identificación de crecimiento de bacterias ácido lácticas se dio por la observación de las características de las colonias en agar MRS y agar MRS + Azul de Anilina (figura 11 y 12).

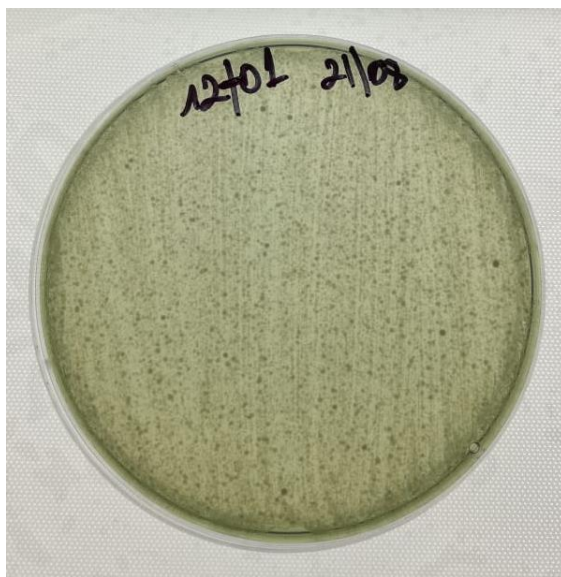


Figura 11: Crecimiento de la cepa M12 en agar MRS sin azul de anilina, donde se observa un crecimiento uniformes sin coloración en las colonias.

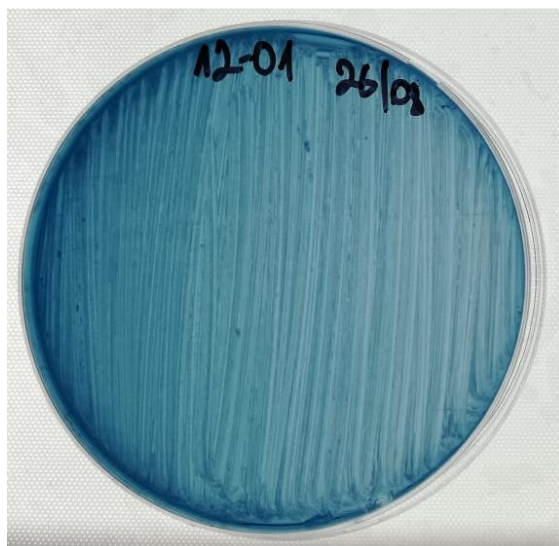


Figura 12: Crecimiento de bacterias ácido lácticas en agar MRS con azul de anilina al 0.2%, se observa coloración en el crecimiento, ausencia de patógenos.

Se identificó que la cepa M12, era “pura” pues se encontraba sin patógenos; una de las características del agar MRS con azul de anilina, es el cambio de color, donde se puede apreciar dos tonos típicos, verde, cuando se trata de una cepa de BAL con contaminantes y azul, cuando se obtiene un cultivo puro de bacterias ácido lácticas; esta identificación de la pureza de la cepa, permitió continuar con el proceso de antagonismo, aclarando que no ha interferencias, sin embargo, el crecimiento obtenido en el agar MRS + azul de anilina, es solo de confirmación, en ningún instante se utilizó para las pruebas de inhibición y caracterización, pues el colorante se convierte en una interferencia para los otros procesos.

Se realizó una siembra por agotamiento del patógeno en agar EMB para la verificación de que el patógeno que estábamos trabajando fuera correctamente *E. coli* y como se puede observar en la figura 13 el crecimiento e identificación fueron los esperados

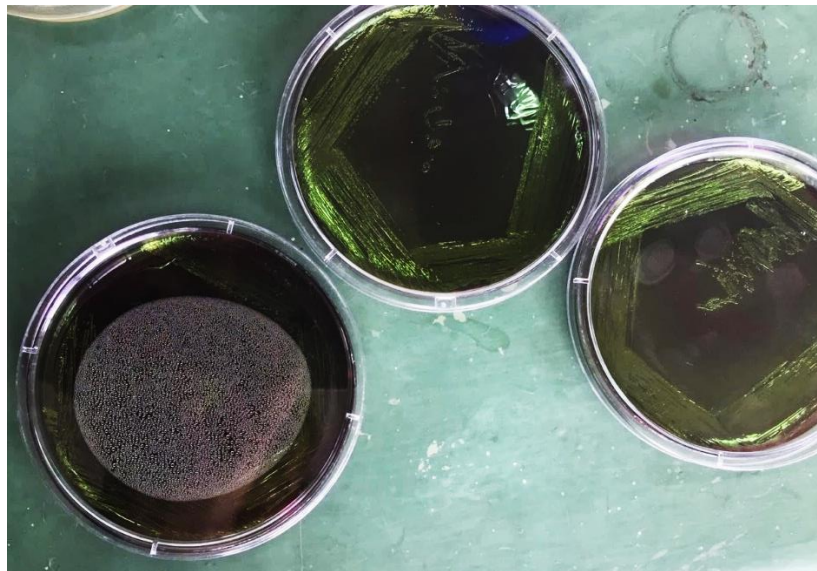


Figura 13: Crecimiento de *E. coli* en agar EMB, identificación de cepa.

6.2 Prueba de antagonismo de bacterias ácido lácticas frente a un patógeno

Se realizó una prueba de antagonismo donde se reemplazaron los sensidiscos por agar, lo que se hizo fue cortar con el extremo ancho y circular de una punta azul, para micropipeta, unos trozos de agar inoculado con la BAL, de la cepa M12 y *L. lactis* y con mucho cuidado se colocaron en una caja de Petri donde previamente se inoculo *E. coli* poniendo la cara donde están las BAL sobre el patógeno.

Una vez se tienen los trozos de agar en la caja con el patógeno esta se lleva a incubación por 48 horas a 37°C para que se dé el crecimiento del patógeno y poder observar si se da el halo de inhibición del crecimiento del patógeno alrededor de los trozos con BAL.

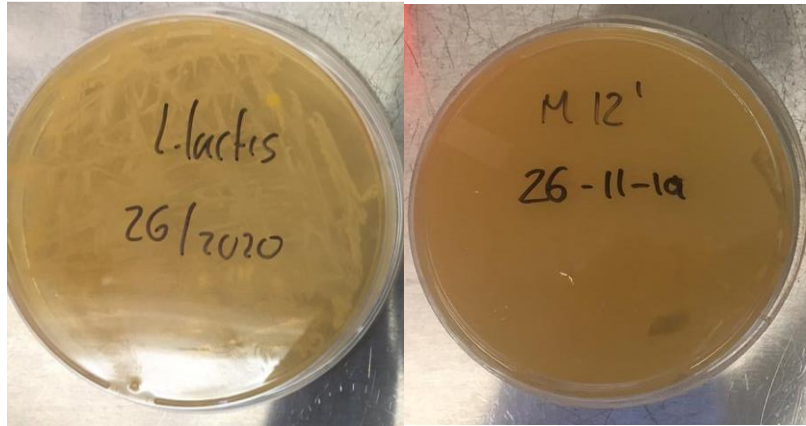


Figura 14: Crecimiento de la cepa M12 y *L. lactis* en agar MRS sin azul de anilina.

- *Capacidad de inhibición de E. coli*

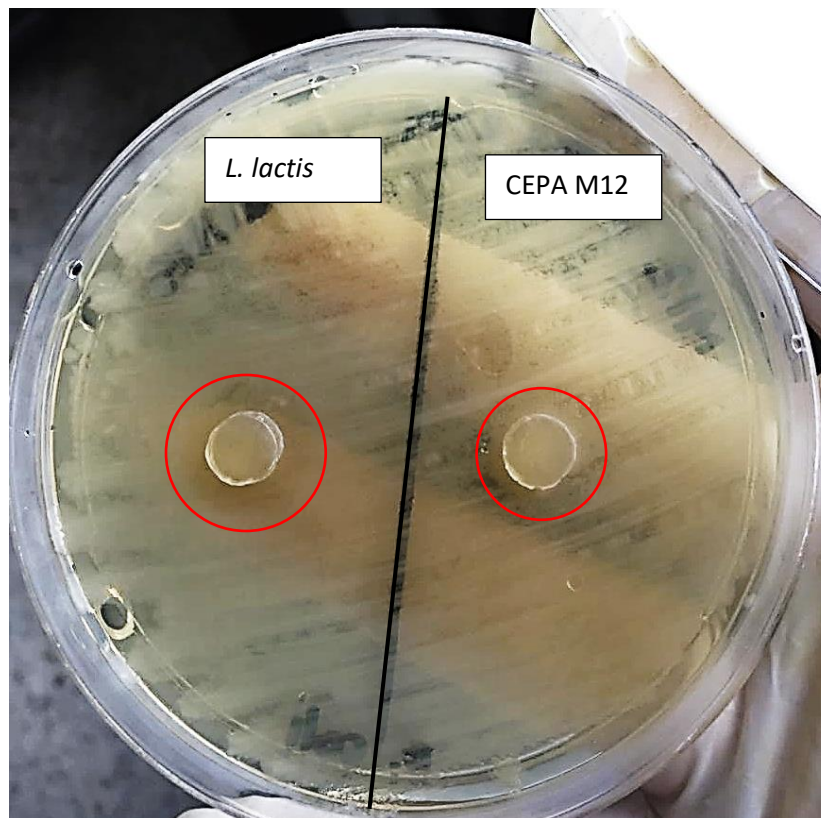


Figura 15: Identificación de halo de inhibición generado por *L. lactis* y M12 frente a *E. coli*.

Se pudo observar la aparición de halo de inhibición en esta prueba in vitro, sin embargo, no se realizó la medición del diámetro, por otro lado no se pudo continuar con estos ensayos ya que se tuvo que parar el proyecto debido a la pandemia causada por la COVID-19, lo que impidió también realizar el procedimiento de la prueba in vivo de inhibición directa de las

BAL frente a *E. coli* añadido directamente a la muestra de queso fresco y determinar el éxito o no de esta prueba de inhibición, así mismo, no se realizó el análisis estadístico pertinente.

6.3 Caracterización de consorcio microbiano

6.3.1 Extracción y cuantificación de ADN

Los protocolos empleados para la extracción de ADN fueron ejecutados con un mes de diferencia cada uno, donde se evaluó la pureza de cada producto que estos kits brindaban (tabla 9), con el primer kit de extracción se presentaron dudas con la pureza del ADN producto (pellet), se revisó y aclaró que el reactivo QuickExtract estaba vencido, por lo que posiblemente generó un mal resultado en la pureza de ADN, este es reconocido como un impedimento para la correcta ejecución del proceso de la PCR, donde se verá interrumpido por posibles proteínas adheridas a la molécula.

Tabla 9: Determinación de pureza de productos de ADN extraído.

Muestra	Relación de absorbancias 260/280nm		Promedio \pm SD
Muestras de ADN por QuikExtract™			
Muestra 11	1,751	1,791	1,73 \pm 0,06
Muestra 12	1,788	1,779	
<i>Lactobacillus casei</i> *	1,662	1,650	
Muestras de ADN por Bioline			
Muestra 1 (M12-01)	1,192	1,322	1,09 \pm 0,12
Muestra 2 (M12-02)	1,113	0,9845	
Muestra 3 (M12-03)	1,158	1,029	
Muestra 4 (M12-04)	1,025	0,9273	
Se tomó un promedio de la pureza medido en absorbancia a una longitud de onda entre 260 y 280nm, valores representados en absorbancia. La medición fue por duplicado. *Cepa de referencia tomada del cepario de la Universidad Libre seccional Pereira.			

Las muestras 11 y 12 fueron los primeros controles de bacterias ácido lácticas obtenidas directamente del queso fresco producido en la región cafetera; en el aislamiento de ambas muestras en agar MRS con azul de anilina, se evidenció que la muestra 11 presentaba contaminación pues el medio permanecía de color verde mientras que la muestra 12 (M12) mantenía el color azul en el medio, por lo que se decidió continuar con esta cepa durante la ejecución del proyecto, identificando la pureza de la cepa aislada.

Durante el desarrollo del proyecto se tomó muestras de superficie y parte interior del queso, fue una prueba que se realizó, donde se tomó 5 gramos de la superficie del queso y 5 gramos del interior del queso fresco, estos se resuspendieron, por separado en 100 mL de agua destilada, se llevaron al Stomacher para hacer la homogenización y después se tomó de cada

bolsa 200 μ L y se adicionaron en un tubo falcon con 200 μ L de la solución QuickExtract™, posteriormente se procedió con el protocolo de extracción y de PCR. Al observar la calidad del ADN por electroforesis, se determina que el producto no fue viable, se reconoce que se perdió y no funcionó el kit de QuickExtract™ directamente con el queso, se logró identificar, que este método de extracción funciona de manera positiva con fuentes de cultivo bacteriano puro en medios sólidos o líquidos.

Para la identificación de la concentración obtenida por el kit comercial de extracción, se realizó la cuantificación con el equipo espectrofotómetro MultiSkan GO de Thermo Scientific™, este mide la absorbancia producida en una longitud de onda de 260nm, esta longitud mide la capacidad de absorción del ADN, posteriormente, el valor de la absorbancia se multiplica por el factor de medición de concentración celular, el cual es 50, para una molécula de doble cadena (tabla 10).

Tabla 10: Cuantificación muestras de ADN

Muestra	Redox Spectral (A - 260 nm)	Concentración μ g/ mL
Muestras de ADN por QuickExtract™		
Muestra 11	0.4816	24.08
Muestra 12	0.25755	12.87
Muestras de ADN por Bioline		
Muestra 1	0.06505	1.4
Muestra 2	0.17035	8.5
Muestra 3	0.0647	3.7
Muestra 4	0.02835	1.4

6.3.2 Electroforesis y verificación de la calidad de ADN

Se observó la calidad del ADN después del proceso de la PCR, identificando también el tamaño de amplificado; inicialmente, se realizó un alineamiento por BLAST de los primers Forward (F) y Reverse (R) para el gen 16S RNA ribosomal, obtenido en valor de diferencia desde el primer nucleótido del Primer F, hasta el último nucleótido del Primer R, esto con la idea de obtener un posible valor del tamaño al que amplifica este gen en las especies de bacterias productoras de ácido láctico, donde se señaló que el rango del tamaño que amplifican estos primers va desde 1.3 y 1.5 kb = entre 1.300 y 1.500 pb; sin embargo, este tamaño puede variar dependiendo de la especie y cepa; finalmente se hicieron correcciones en los tiempos de corrida de la electroforesis.

Para el producto de PCR proveniente de la extracción por QuickExtract™, no se esperaba que fuera tan compacto el resultado en electroforesis (figura 16), pues este producto al ser empleado en una metodología de ejecución rápida se esperaba a que la pureza y calidad del

ADN, fuera menor a comparación con los productos provenientes del kit de Bioline. Por otra parte, se obtuvo una amplificado de tamaño entre 1.300 y 1.500 pares de bases.

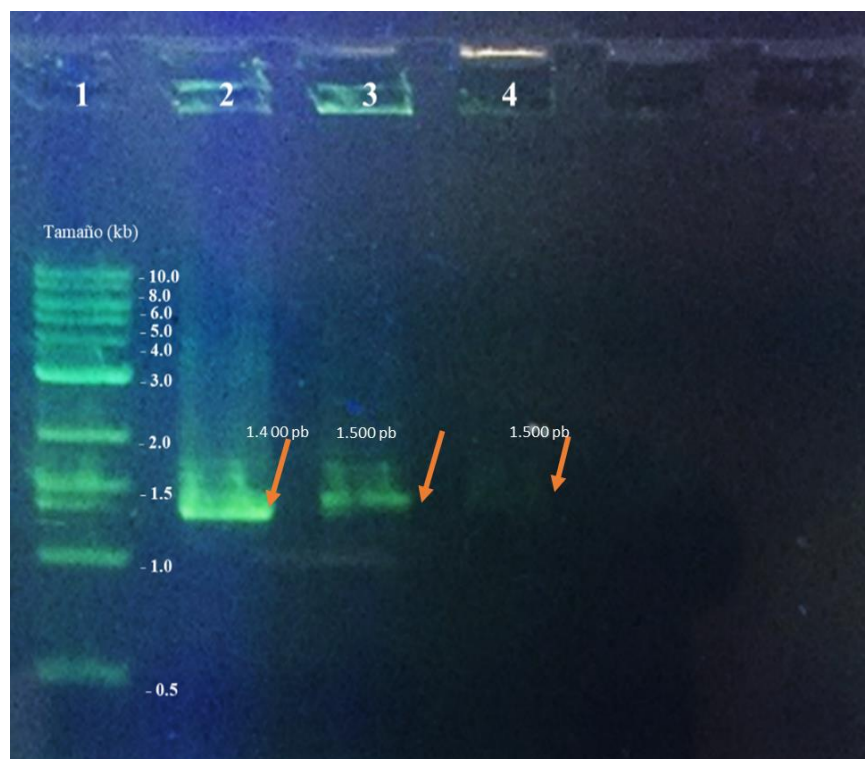


Figura 16: Electroforesis producto PCR, muestra extraída por protocolo QuickExtract.

Se observó que la muestra 2 correspondiente a la cepa M11, presenta una varianza a en el tamaño del gen amplificado a comparación de la cepa M12 (carril 3), sin embargo, ambas permanecen dentro del rango de tamaño entre 1.300 y 1.500 pb, tamaño descrito para el gen 16S; con la muestra en el carril 4, atribuida a *L. casei*, se identifica, que esta no es de buena calidad pues el material genético no se observa fuertemente como las otras muestras, para este resultado se redactaron 2 posibles causas, la primera va encaminada a el uso del kit de QuickExtract, donde se pierde la pureza del ADN, como se encuentra contemplado en la tabla 9, la otra causa va atribuida al momento de cargar las muestras en el gel de agarosa donde posiblemente no se tuvo cuidado y se pudo traspasar el gel, adicionalmente, también la pérdida de esta muestra puede ser por el mal uso de las concentraciones del buffer de carga.

El kit de Bioline también se encontraba vencido incluyendo las columnas, por lo que el material genético se perdía fácilmente y no se obtenía una buena carga esencial para el desarrollo de las demás pruebas incluyendo cuantificación, PCR y finalizando con la electroforesis; en este último paso se pudo evidenciar un corrido de las muestras producto de PCR, donde las 4 muestras distribuidas en los carriles 2, 3, 4 y 5, fueron las que se pudieron visualizar (figura 17).



Figura 17: Electroforesis de productos de PCR, generados por el kit de extracción de Bioline.

Las muestras de M12 utilizadas en este proceso fueron obtenidas en diferentes tiempos, las muestras de los carriles 2 y 3 fueron aisladas el 02 de Octubre de 2019 y las de los carriles 4 y 5 fueron aisladas el 11 de Diciembre de 2019, ambos aislamientos fueron conservadas en Cryobank almacenadas en el cepario de la Universidad Libre seccional Pereira; pero el proceso de electroforesis mostrado en la figura 17, se realizó el 05 de Febrero de 2020; estos tiempos de almacenamiento son un papel importante para la determinación de la pureza de ADN, inclusive si esta será enviada a secuenciar; se observa que las muestras de los carriles 3 y 4 son más difuminadas que las que están en los carriles 2 y 5, no se reporta el porqué de este suceso. En los carriles 6, 7, 8 y 9 de la figura 17, se cargaron con muestras de la cepa M12 obtenidas el 26 de agosto de 2019, por el tiempo de almacenamiento se puede deducir que hay un deterioro en el material genético, pues se ha descrito que el estrés a temperaturas bajas cambios en el superenrollamiento del DNA impidiendo que se den los procesos de replicación, transcripción y traducción.

El kit de Stratec fue el último protocolo empleado para la extracción de DNA y no se encontraba vencido, todo el protocolo se ejecutó el 13 de marzo de 2020, no obstante, no se pudo realizar una secuencia para la amplificación por PCR ni verificación por electroforesis debido a la pandemia causada por la COVID-19, de esta manera, no se tiene registro fotográfico de este proceso. Igualmente, no se pudo ejecutar la secuenciación de la cepa M12, por la misma causa.

Durante el proyecto se logró identificar que hay una manifestación de inhibición del crecimiento de *E. coli* frente a la presencia de bacterias ácido lácticas BAL tal como se menciona en el artículo “ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF A BACTERIOCIN PRODUCED By *Enterococcus faecalis* KT11 AGAINST SOME PATHOGENS AND ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA” en donde lograron observar mediante el ensayo

realizado que la bacteriocina CV7 de *E. faecalis* exhibía una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas en donde el tamaño del halo de inhibición oscilaba entre 14 y 18 mm. (Abanoz and Kunduhoglu 2018) (46). De igual forma también se pudo evidenciar la característica de inhibición de otra bacteria ácido láctica como lo es *Lactobacillus plantarum* frente a *E. coli* como se puede ver en el artículo “EFECTO SIMBIÓTICO DEL EXTRACTO DE *Smilax sonchifolius* y *Lactobacillus plantarum* FRENTE A *Escherichia coli*” donde evidenciaron que el extracto de yacón, como fuente natural de prebióticos, estimuló el crecimiento de *L. plantarum* y, por el contrario, mantuvo el crecimiento de *E. coli* enteropatógena a bajos niveles poblacionales. La mezcla del extracto de yacón y *L. plantarum* inhibió el crecimiento de *E. coli* enteropatógena (47). Por otro lado, la importancia de reconocer molecularmente consorcios microbianos con posibles usos en la industria se vuelve más grande, sin embargo, los procesos de obtención de ADN con kits comerciales, puede generar interferencias; hay investigaciones que reportan la evaluación del uso de kits comerciales, identificando la pureza del producto de estos mismos; entre los resultados obtenidos por el uso de la solución QuickExtract™, se pudo observar que esta solución puede ser una posible ayuda en investigaciones con muchas muestras, pues es eficiente y tiene un nivel de pureza medianamente bueno (42). Con el protocolo de Bioline, se ha reportado que este es un kit muy sensible, pues la extracción por columnas, se ha convertido en el uso constante en las extracciones, inclusive la calidad de los productos de ADN por Bioline pueden ser mejores, como está mencionado en el artículo (Guevara M, 2019) las bandas de PCR en electroforesis pueden ser más intensas y fuertes en comparación de los productos de otros kits, sin embargo no hay una restricción de uso de los otros protocolos; inclusive también se menciona en esta investigación que los productos de PCR obtenidos por el método de columnas de Bioline son de buen espectro de amplificación (48).

En cuanto a la secuenciación, no se tienen registros, pero se ha demostrado que la caracterización de consorcios microbianos mediante el gen 16S de RNA ribosomal, es un éxito, pues al ser un gen tan conservado y reconocido en la mayoría de microorganismos, se vuelve más útil para este tipo de investigaciones (13) (49); igualmente todos los resultados de secuenciación son analizados por herramientas bioinformáticas dando una exactitud de conocer las especies que hace parte de estos consorcios (30). Este proceso de secuenciación no garantiza una identificación del 100% del consorcio, como lo menciona (K. Veljovic, 2007) lograron identificar la mitad de las bacterias que hacen parte como microbiota inicial del queso Zlata, reconociendo que los géneros de *Lactococci* y *Lactobacillus* son predominantes en el queso, pero el número de microorganismos puede variar dependiendo del tiempo de almacenamiento y pH del queso que cambia con el tiempo, esto permite describir que las condiciones de almacenamiento de queso, puede ser un interferente para la identificación molecular de la microbiota, pero también afecta la inocuidad del alimento, pues la presencia de microorganismos patógenos no autóctonos del queso, son interferentes en el crecimiento de los microorganismos que componen la microbiota del queso, siendo este uno de los principales riesgos para la salud pública (50).

7 CONCLUSIÓN

Se logró identificar la presencia de bacterias ácido lácticas en un queso fresco de la región.

Las bacterias ácido lácticas aisladas del queso fresco presentaron un efecto de inhibición frente al crecimiento de *E. coli*.

La amplificación del gen RNA ribosomal 16S se logró y se pudo observar el tamaño de amplificado por electroforesis, identificando que cumplía con el tamaño descrito en la bibliografía.

8 RECOMENDACIONES

Continuar con las pruebas de identificación de capacidad antimicrobiana en *E. coli* de las bacterias ácido lácticas, evaluando diferentes metodologías, incluyendo la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), de la cepa M12.

Realizar secuenciación del gen ARN ribosomal 16S para la identificación del consorcio microbiano utilizado en esta investigación, dándole continuidad a la caracterización molecular.

Evaluar las características bioquímicas de las bacterias ácido lácticas obtenidas del queso fresco.

Identificar el gen responsable del efecto antimicrobiano caracterizado por la inhibición de crecimiento en *E. coli*

Identificar la capacidad antagonista de la cepa M12 frente a otros microorganismos patógenos del queso fresco comercializado en el departamento de Risaralda, incluyendo bacterias como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, entre otros.

9 AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios, quien nos ha llenado de entendimiento y sabiduría en cada momento de este proceso educativo.

A nuestras familias, que día y noche nos brindaron su apoyo incondicional y ahora nos ven cumpliendo satisfactoriamente un nuevo ciclo en nuestras vidas.

A la Universidad Libre seccional Pereira y a cada uno de los maestros del programa que hicieron parte de nuestro crecimiento profesional y personal; gracias a su idoneidad, nos sentimos competentes con la formación brindada para prestar un servicio a la sociedad.

Al Sistema General de Regalías convenio 033 en el proyecto de investigación “Mejoramiento de la calidad microbiológica y sanitaria del queso fresco producido en pequeña escala en 14 municipios del Departamento de Risaralda” por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

Agradecemos especialmente al Doctor Fernando Siller López por su apoyo y dedicación para con nosotros, por dedicar de su tiempo y extendernos su valioso conocimiento profesional y personal; porque siempre nos motivó a seguir adelante con este proceso y nos brindó la ayuda adecuada con herramientas teóricas y prácticas importantes para la elaboración del proyecto.

A Karen Holguín, microbióloga egresada de la Universidad Libre seccional Pereira, por darnos su apoyo desde el inicio de la elaboración de este proyecto, por ampliar su conocimiento con nosotros y guiarnos como futuros profesionales.

A nuestros compañeros, los cuales conocimos durante estos 5 años, siendo ahora personas valiosas por su gran soporte en este tiempo.

Nuestro completo agradecimiento a todos ellos y les seguiremos demostrando que día a día, daremos lo mejor de nosotros para ser unos excelentes profesionales y unas personas capaces de salir adelante a pesar de las circunstancias.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parra Huertas R. Review. bacterias acido lacticas: papel funcional en los alimentos. *Biotechnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial BSAA*. 2010;8(1):93–105.
2. Enfermedades) C (Centro para el C y la P de. ecoli-and-food-safety @ www.cdc.gov [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/ecoli-and-food-safety.html>
3. Uscanga-Domínguez LF, Orozco-García IJ, Vázquez-Frias R, Aceves-Tavares GR, Albrecht-Junghans RE, Amieva-Balmori M, et al. Technical position on milk and its derivatives in adult health and disease from the Asociación Mexicana de Gastroenterología and the Asociación Mexicana de Gerontología y Geriatria. *Rev Gastroenterol Mex*. 2019;84(3):357–71.
4. Button JE, Dutton RJ. Cheese microbes. *Curr Biol* [Internet]. 2012;22(15):R587–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.014>
5. Antunes AEC, Graef ET, Moreno I, Rodrigues LG, Dourado FM, Saccaro DM, et al. Selective enumeration and viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in a new fermented milk product. *Brazilian J Microbiol*. 2007;38(1):173–7.
6. Técnica N. Productos lácteos. queso. 2019;1–17.
7. Moreno Galarza LJ. Aislamiento y Selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas. *Posgrado Interfacultades Microbiol*. 2012;Maestría e:109.
8. Alfonso E, Herrera C. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica 1 . 2014;(August).
9. Colombo M. Beneficial properties of lactic acid bacteria naturally occurring in dairy production systems. 2018;1–12.
10. Carr FJ, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit Rev Microbiol*. 2002;28(4):281–370.
11. M. GD. AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS ACIDOLACTICAS CON CAPACIDAD ANTAGONICA A PARTIR DE PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS ARTESANALMENTE. *Pontif Univ Javeriana*. 2013;1–11.
12. Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*. 1997;36(1):1–29.
13. Zea V, Adriana L, Campuzano M. Molecular identification and evaluation of the probiotic ability of lactic acid bacteria from sow colostrum α . 2015;
14. Gobbetti M, De Angelis M, Corsetti A, Di Cagno R. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci Technol*. 2005;16(1–3):57–69.

15. Larrea C. H, Flórez F. M, Huapaya Y. J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I. *Horiz méd.* 2007;(June 2007):16–22.
16. Reis JA, Paula AT, Casarotti SN, Penna ALB. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Eng Rev.* 2012;4(2):124–40.
17. Rodríguez E, González B, Gaya P, Nuñez M, Medina M. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int Dairy J.* 2000;10(1–2):7–15.
18. Ramos-Izquierdo B, Bucio-Galindo A, Bautista-Muñoz C, Aranda-Ibáñez E, Izquierdo-Reyes F, Izquierdo Reyes F. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Univ y Cienc.* 2009;25(2):159–71.
19. Alvarez-sieiro P, Montalbán-lópez M, Mu D, Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria : extending the family. 2016;
20. Heredia-Castro PY, Hernández-Mendoza A, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia.* 2017;42(6):340–6.
21. Snyder AB, Worobo RW. Chemical and genetic characterization of bacteriocins : antimicrobial peptides for food safety. 2013;(May).
22. Rodríguez JM, Martínez MI, Horn N, Dodd HM. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2003;80(2):101–16.
23. Ortiz MLA, Carrara XC. Diagnóstico, tendencias en investigación y áreas de oportunidad. Yucatán, México [Internet]. 2017;(December). Available from: https://www.researchgate.net/profile/Mariela_Reyes/publication/331962873_Bacterias_y_hongos_con_potencial_biodegradador_de_hidrocarburos_en_diversos_ambientes/links/5e4af4f8a6fdccd965aedcc3/Bacterias-y-hongos-con-potencial-biodegradador-de-hidrocarburos-e
24. Gao Z, Daliri EB, Wang JUN, Liu D, Chen S, Ye X, et al. Inhibitory Effect of Lactic Acid Bacteria on Foodborne Pathogens : A Review. 2019;82(3):441–53.
25. Quevedo F. Enfermedades transmitidas por los alimentos. *Hig Aliment.* 1984;3(3/4):167–76.
26. Castellanos NAM, Gómez LMP, Parra AKC, Neiza NCG, Rodríguez MCO, Neira YS. Revista cubana de higiene y epidemiología. [Internet]. Vol. 56, Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. Editorial Ciencias Médicas; 2019 [cited 2020 Jun 2]. Available from: <http://www.revepidemiologia.sld.cu/index.php/hie/article/view/171/260#.XtbGtJSfyU.mendeley>
27. Agudelo N, Torres M, Alvarez C, Vélez L. Bacteriocinas Producidas Por Bacterias Ácido Lácticas Y Su Aplicación En La Industria De Alimentos. *Aliment hoy* [Internet]. 2015;23(36):63–72. Available from:

<http://www.alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/356>

28. Hernández-lauzardo AN, Bautista-baños S, Gerardo M, Valle V, Nacional IP, Productos CDD De, et al. Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. 2007;66–74.
29. Chávez M, Antonio J, González A, Noé C, Herrera R. Bacteriocinas : características y aplicación en alimentos Bacteriocins : characteristic and applications in foods. 2013;
30. Jos E, Princesa S La. caracterización de la microbiota [Library generation through 16S ribosomal RNA gene amplification for det ... DEL ARN RIBOSOMAL 16S PARA LA CARACTERIZACIÓN LIBRARY GENERATION THROUGH RIBOSOMAL RNA 16S GENE Laboratory Medicine at a glance. 2016;(December).
31. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985;82(20):6955–9.
32. Valenzuela-gonzález F, Casillas-hernández R, Villalpando E, Vargas-albores F. The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. 2015;41:297–313.
33. Fox GE, Pechman KR, Woese CR. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to procaryotic systematics. Int J Syst Bacteriol. 1977;27(1):44–57.
34. Chagnaud P, Machinis K, Coutte LA, Marecat A, Mercenier A. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: Application to six common Lactobacillus species. J Microbiol Methods. 2001;44(2):139–48.
35. Kawthar MA, Hanan BE, Yousif FHE, Ahmed EE. Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from starter dough of Sudanese sorghum fermented flat bread (Kissra). Pakistan J Nutr. 2018;17(2):57–63.
36. R AC. Biología molecular en Infectología Parte I : Desarrollo y metodologías. 2002;19:14–24.
37. Introduction C, Pcr T, Components R, Primers DPCR, Software PD, Pcr T, et al. The Polymerase Chain Reaction. 2011;1–21.
38. So A. iMedPub Journals Molecular Characteristics of Probiotics Lactic Acid Bacteria Isolated from Soursop , Cowmilk , Goatmilk Yoghurts and Cheese Abstract. 2017;1(1):1–9.
39. CAMPION RDN, TEC JCC. Secuenciación de ácidos nucleicos. 2004;
40. Ercolini D. High-throughput sequencing and metagenomics: Moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. Appl Environ Microbiol. 2013;79(10):3148–55.
41. Cock LS. Lactic acid production by a strain of Lactococcus lactis subs lactis isolated from sugar cane plants. 2006;9(1).

42. Qet CN. QuickExtract™ DNA Extraction Solution. 2018;
43. Extraction HE. Nucleic Acid Isolation Guide.
44. Tilahun B, Tesfaye A, Muleta D, Bahiru A, Terefework Z, Wessel G. Isolation and Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Using 16s rRNA Genes from Fermented Teff (*Eragrostis tef* (Zucc .)) Dough. 2018;2018.
45. Martínez-barragán IK, González-martínez BE, Campos-góngora E, Barba AP. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PROBIOTICOS AISLADOS DE ALIMENTOS Y SUPLEMENTOS : COMPARACIÓN CON MÉTODOS BIOQUÍMICOS. 2002;(7).
46. Abanoz HS, Kunduhoglu B. Antimicrobial activity of a bacteriocin produced by enterococcus faecalis kt11 against some pathogens and antibiotic-resistant Bacteria. Korean J Food Sci Anim Resour. 2018;38(5):1064–79.
47. Lactobacillus YY, Escherichia A. EFECTO SIMBIÓTICO DEL EXTRACTO DE *Smallanthus sonchifolius* (YACÓN) Y *Lactobacillus plantarum* FRENTE A *Escherichia coli*. Cienc Invest. 2013;16(2):77–82.
48. Guevara-vega M, Vertel-morinson M, Paternina LE. Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de garrapatas duras (Acari : Ixodidae) Comparison of three DNA extraction methods from hard ticks (Acari : Ixodidae). 2019;(1):1–10.
49. Sim M, Lee J, Lee D, Kwon D, Kim J. TAMA : improved metagenomic sequence classification through meta-analysis. 2020;1–17.
50. Veljovic K, Vukasinovic M, Strahinic I, Begovic J, Lozo J, Ostojic M. Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. 2007;103:2142–52.