



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA  
SALUD

**TESIS DOCTORAL**

**Biodiversidad bacteriana del queso Paipa,  
selección de bacterias ácido lácticas y  
caracterización de sus compuestos  
antibacterianos**

**PRESENTADA POR:  
José Castellanos Rozo**

**DIRIGIDA POR:  
Rubén Pérez Pulido y  
Antonio Gálvez del Postigo**

**JAÉN, 25 de Julio de 2020**  
ISBN

# Biodiversidad bacteriana del queso Paipa, selección de bacterias ácido lácticas y caracterización de sus compuestos antibacterianos

Memoria para optar al grado de Doctor  
Jaén, Julio de 2020



Fdo.: José Castellanos Rozo Aspirante  
al Grado de Doctor

*Los Directores del trabajo:*

PEREZ PULIDO  
RUBEN - 75018539Z

Firmado digitalmente por PEREZ  
PULIDO RUBEN - 75018539Z  
Fecha: 2020.10.01 12:08:54  
+02'00'

*Fdo.: Rubén Pérez Pulido*

GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ  
ANTONIO MIGUEL - 25041147N

Firmado digitalmente por GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ ANTONIO MIGUEL - 25041147N  
Nombre de reconocimiento DNE: c=ES, serialNumber=DNCS25041147N,  
givenName=ANTONIO MIGUEL, o=GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ, cn=GALVEZ DEL POSTIGO  
RUIZ ANTONIO MIGUEL - 25041147N  
Fecha: 2020/10/01 11:32:15 +02'00'

*Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz*

Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud  
Facultad de Ciencias Experimentales  
Universidad de Jaén

Los directores de tesis **D. Rubén Pérez Pulido** y **D. Antonio Gálvez del Postigo Ruiz**, pertenecientes al Área de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

**HACEN CONSTAR:** Que el trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral:  
**“Biodiversidad bacteriana del queso Paipa, selección de bacterias ácido lácticas y caracterización de sus compuestos antibacterianos”** presentado por **D. José Castellanos Rozo** ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, cumpliendo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al Grado de Doctor.

Jaén, julio de 2020

PEREZ PULIDO RUBEN - 75018539Z	Firmado digitalmente por PEREZ PULIDO RUBEN - 75018539Z Fecha: 2020.10.01 12:09:18 +02'00'
--------------------------------------	--

Fdo.: Rubén Pérez Pulido

GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ ANTONIO MIGUEL - 25041147N	Firmado digitalmente por GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ ANTONIO MIGUEL - 25041147N Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, serialNumber=IDCES-25041147N, givenName=ANTONIO MIGUEL, sn=GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ, cn=GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ ANTONIO MIGUEL - 25041147N Fecha: 2020.10.01 11:32:38 +02'00'
--	---

Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en primer lugar a Dios Todopoderoso por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis al lado de personas maravillosas, con las cuales pude compartir y aprender.

A mi familia, a mi esposa e hijos por su amor, paciencia y aceptación durante el desarrollo de este trabajo. A mis hermanos y a mi madre por su apoyo.

A las directivas de la Universidad de Boyacá, de la Universidad de Jaén y de la AUIP, quienes abrieron el camino para que mis compañeros y yo pudiéramos tener esta increíble oportunidad de hacer los estudios de Doctorado en España.

A mis directores de tesis, Antonio Gálvez del Postigo y Rubén Pérez Pulido por su apoyo y orientación durante todo este proceso, a las profesoras María José Grande, Rosario Lucas, y al profesor Antonio Cobo, quienes siempre estuvieron pendientes de mi trabajo, me ayudaron y me enseñaron a lo largo del trabajo experimental. A las profesoras Malema y Elena por compartir esta bella experiencia.

A la asociación de productores del queso Paipa (ASOQUESOPAIPA), quienes me ayudaron con los muestreos y a enfocar el trabajo teniendo en cuenta las problemáticas del sector lechero de Boyacá, Colombia.

A la unidad de proteómica y micosis humanas de la Universidad Javeriana sede Bogotá quienes me ayudaron en el análisis de MALDITOF-MS.

A mis compañeros que compartieron conmigo las estancias en la Universidad de Jaén. Especialmente a mis compañeros de la Universidad de Boyacá Ricardo Cifuentes, María Inés Torres, Claudia Patricia Jaimes y Claudia Patricia Quevedo, quienes fueron un gran apoyo en todo sentido, sobre todo en esos momentos de soledad, lejos de mi familia.

Quiero agradecer a todos aquellos compañeros de laboratorio Wendy Marín, Gerónimo Flores, Josisleine Allaion Ferreira, Jorge Avalos, Laura Mena, Ana María García, Laura Morales, Zacaria Boutarfi, Karla Parada, Javier Rodríguez, Diego, Ana, con quienes tuve la oportunidad de compartir. A mis compañeros del Departamento de Biología y Microbiología de la Universidad de Boyacá, a la profesora Jaqueline Galvis a Rocío Milena Buitrago, a las técnicas del laboratorio quienes estuvieron allí para facilitarme el trabajo. ¡Muchas gracias!

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	6
<b>INTRODUCCIÓN</b>	11
<b>I.- El queso</b>	12
I.1.- El queso y su consumo a nivel mundial	12
I.2.- Tipos de quesos a nivel mundial	13
I.2.1.- Quesos artesanales con denominación de origen elaborados con leche de vaca cruda	14
I.2.1.1.- El queso Paipa	17
<b>II.- Microbiología de los quesos artesanales madurados</b>	20
II.1.- Bacterias que provocan enfermedades por consumo de queso artesanal	20
II.1.1.- Coliformes	21
II.1.2.- <i>Shigella</i> sp.	22
II.1.3.- <i>Salmonella</i> sp.	23
II.1.4.- <i>Staphylococcus</i> sp.	24
II.1.5.- <i>Listeria</i> sp.	26
II.2.- Resistencia a los antibióticos y biocidas	29
II.3.- Bacterias ácido lácticas	31
II.3.1.- Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas	33
II.3.1.1.- Ventajas y desventajas de la aplicación de las bacteriocinas en alimentos	34
II.3.1.2.- Clasificación de las bacteriocinas	36
II.3.1.3.- Bacteriocinas más estudiadas y su efecto sobre bacterias patógenas o alterantes	38
II.3.1.4.- Técnicas utilizadas para seleccionar, caracterizar y purificar bacteriocinas	43
<b>III.- Métodos utilizados para determinar la composición bacteriana del queso</b>	49
III.1.- Métodos dependientes de cultivo	49
III.1.1.- Recuento en placa	49
III.1.2.- Número más probable	50
III.1.3.- Método de enriquecimiento	51
III.1.4.- Métodos de identificación y caracterización bacteriana	52
III.1.4.1.- Métodos fenotípicos	52
III.1.4.1.1.- Caracterización macroscópica	53
III.1.4.1.2.- Caracterización microscópica	53

III.1.4.1.3.- Caracterización bioquímica	53
III.1.4.1.4.- Pruebas de resistencia o tolerancia	55
III.1.4.1.4.1.- Pruebas de tolerancia a temperatura, pH, concentración de NaCl	55
III.1.4.1.4.2.- Pruebas de resistencia a antibióticos y tolerancia a biocidas	56
III.1.4.1.4.2.1.- Método de difusión en disco	56
III.1.4.1.4.1.2.- Método de dilución	57
III.1.4.2.- Métodos inmunocromatográficos	59
III.1.4.3.- Métodos genéticos	59
III.1.4.4.- Métodos proteómicos	61
III.2.- Métodos independientes de cultivo	64
III.2.1.- Huella genética de una comunidad ( <i>Genetic fingerprinting</i> )	64
III.2.2.- Hibridación <i>in situ</i> ( <i>Fluorescence in situ hybridization, FISH</i> )	67
III.2.3.- Chips de ADN (Microarrays)	68
III.2.4.- PCR en tiempo real ( <i>Realtime PCR</i> )	69
III.2.5.- Métodos de secuenciación	70
III.2.5.1.- Secuenciación Sanger	71
III.2.5.2.- Secuenciación de nueva generación ( <i>Next Generation Sequencing</i> )	72
<b>IV.- OBJETIVOS</b>	77
<b>V.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	79
<b>V.1.- Análisis de la diversidad bacteriana del queso Paipa por secuenciación masiva</b>	80
V.1.1.- Muestreo de los quesos	80
V.1.2.- Extracción de ADN	80
V.1.3.- Secuenciación de ADN	81
V.1.4.- Análisis de las secuencias de ADN	81
<b>V.2.- Evaluación de la calidad microbiológica del queso Paipa comercializado por empresas formales e informales</b>	82
V.2.1.- Recuento de bacterias potencialmente patógenas presentes en el queso Paipa	82
V.2.1.1.- Muestreo de los quesos	82
V.2.1.2.- Recuento de las poblaciones microbianas	82
V.2.1.2.1.- Recuento de aerobios mesófilos	82

V.2.1.2.2.- Recuento de mohos y levaduras	83
V.2.1.2.3.- Recuento de estafilococos	83
V.2.1.2.4.- Recuento de coliformes totales y fecales	83
V.2.1.2.5.- Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i>	84
V.2.1.2.6.- Recuento de <i>Salmonella</i> sp.	84
V.2.1.3.- Conservación de los aislamientos bacterianos	84
V.2.2.- Identificación de los aislamientos por secuenciación del gen ARNr 16S	85
V.2.3.- Susceptibilidad a los antimicrobianos	86
V.2.4.- Susceptibilidad a los biocidas	86
<b>V.3.- Selección y caracterización de bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana contra bacterias potencialmente patógenas aisladas del queso Paipa</b>	87
V.3.1.- Recuento y aislamiento de bacterias ácido lácticas	87
V.3.2.- Selección de las bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana	87
V.3.2.1.- Prueba oxidasa	88
V.3.2.2.- Prueba catalasa	88
V.3.2.3.- Características microscópicas	88
V.3.2.4.- Actividad antimicrobiana	89
V.3.3.- Caracterización de los aislamientos seleccionados	90
V.3.3.1.- Caracterización fenotípica	90
V.3.3.1.1.- Caracterización macroscópica	90
V.3.3.1.2.- Caracterización microscópica	90
V.3.3.1.3.- Caracterización bioquímica	90
V.3.3.1.4.- Pruebas de resistencia	91
V.3.3.1.4.1.- Efecto de la concentración de NaCl sobre las cepas seleccionadas	91
V.3.3.1.4.2.- Efecto de la temperatura sobre las cepas seleccionadas	91
V.3.3.1.4.3.- Efecto del pH sobre las cepas seleccionadas	92
V.3.3.1.4.4.- Susceptibilidad a los antimicrobianos	92
V.3.3.2.- Identificación molecular	92
<b>V.4.- Purificación y caracterización de las sustancias antibacterianas producidas por las bacterias ácidolácticas seleccionadas</b>	92

V.4.1.- Curva de crecimiento de las bacterias ácido lácticas productoras de sustancias antibacterianas	93
V.4.2.- Purificación parcial de las sustancias antibacterianas por cromatografía de intercambio catiónico	93
V.4.3.- Caracterización de las sustancias antibacterianas	94
V.4.3.1.- Efecto de la temperatura sobre las sustancias antibacterianas	94
V.4.3.2.- Efecto del pH sobre las sustancias antibacterianas	95
V.4.3.3.- Efecto de las enzimas proteolíticas sobre las sustancias antibacterianas	95
V.4.3.4.- Efecto de los compuestos químicos sobre las sustancias antibacterianas	95
V.4.3.5.- Espectro de actividad de las sustancias antimicrobianas parcialmente purificadas	96
V.4.3.6.- Determinación del peso molecular de las sustancias antibacterianas por MALDI-TOF MS)	97
<b>VI.- RESULTADOS</b>	98
<b>VI.1.- Análisis de la diversidad bacteriana del queso Paipa por secuenciación masiva</b>	99
VI.1.1.- Características de las lecturas de las muestras secuenciadas	99
VI.1.2.- Poblaciones bacterianas en las muestras de quesos	100
<b>VI.2.- Evaluación de la calidad microbiológica del queso Paipa comercializado por empresas formales e informales</b>	104
VI.2.1.- Recuento y aislamiento de las poblaciones bacterianas	104
VI.2.2.- Identificación de los aislamientos potencialmente patógenos por secuenciación del gen ARNr 16S	106
VI.2.3.- Susceptibilidad a los antimicrobianos	107
VI.2.4.- Tolerancia a los biocidas por las cepas multi-resistentes a los antibióticos	109
<b>VI.3.- Selección y caracterización de bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana</b>	109
VI.3.1.- Recuento de bacterias ácido lácticas	110
VI.3.2.- Selección de las bacterias ácido lácticas productoras de sustancias antibacterianas	110
VI.3.3.- Caracterización de las cepas ácido lácticas seleccionadas	113
VI.3.3.1.- Caracterización fenotípica	113
VI.3.3.1.1.- Caracterización macroscópica	113

VI.3.3.1.2.- Caracterización microscópica	113
VI.3.3.1.3.- Caracterización bioquímica	113
VI.3.3.1.3.- Pruebas de resistencia de las cepas seleccionadas	116
VI.3.3.1.3.1.- Efecto de la concentración de NaCl	115
VI.3.3.1.3.2.- Efecto de la temperatura	116
VI.3.3.1.3.3.- Efecto del pH	117
VI.3.3.1.3.4.- Susceptibilidad a los antibióticos	117
VI.3.3.2.- Identificación molecular de las cepas ácido lácticas seleccionadas	118
<b>VI.4.- Purificación y caracterización de las sustancias antibacterianas producidas por las bacterias ácidolácticas seleccionadas</b>	120
VI.4.1.- Curva de crecimiento de las bacterias ácido lácticas productoras de sustancias antibacterianas	120
VI.4.2.- Purificación parcial de las sustancias antibacterianas por cromatografía de intercambio catiónico	121
VI.4.3.- Caracterización de las sustancias antibacterianas	123
VI.4.3.1.- Efecto de la temperatura sobre las sustancias antibacterianas	123
VI.4.3.2.- Efecto del pH sobre las sustancias antibacterianas	124
VI.4.3.3.- Efecto de las enzimas proteolíticas sobre las sustancias antibacterianas	125
VI.4.3.4.- Efecto de los compuestos químicos sobre las sustancias antibacterianas	126
VI.4.3.5.- Espectro de actividad de las sustancias antimicrobianas parcialmente purificadas	126
VI.4.3.6.- Determinación del peso molecular de las sustancias antibacterianas por MALTI-TOF	128
<b>VII.- DISCUSIÓN</b>	130
<b>VIII.- CONCLUSIONES</b>	153
<b>IX.- REFERENCIAS</b>	156
<b>X.- ANEXOS</b>	181

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Quesos artesanales madurados elaborados únicamente con leche cruda de vaca con denominación de origen en Francia, Italia y España	16
<b>Tabla 2.</b> Requisitos microbiológicos para queso madurados	21
<b>Tabla 3.</b> Bacterias ácido lácticas representativas en la industria de alimentos	32
<b>Tabla 4.</b> Ventajas y desventajas del uso de las bacteriocinas	35
<b>Tabla 5.</b> Características de los métodos de secuenciación de nueva generación	74
<b>Tabla 6.</b> Número de lecturas e índices de diversidad alfa a nivel de género de las muestras de queso Paipa	100
<b>Tabla 7.</b> Análisis microbiológico de quesos Paipa comercializados por microempresas formales e informales	106
<b>Tabla 8.</b> Perfil de sensibilidad de los aislamientos de <i>S. aureus</i> a los antibióticos	108
Tabla 9. Perfil de sensibilidad de los coliformes a los antibióticos	109
<b>Tabla 10.</b> Cepas multirresistentes y su tolerancia a los biocidas	110
<b>Tabla 11.</b> Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>S. aureus</i> por las BAL seleccionadas	112
<b>Tabla 12.</b> Características de las BAL seleccionadas	115
<b>Tabla 13.</b> Efecto de la de la concentración de NaCl sobre las cepas seleccionadas	116
<b>Tabla 14.</b> Efecto de la temperatura sobre las cepas seleccionadas	117
<b>Tabla 15.</b> Efecto de la temperatura sobre el crecimiento las cepas seleccionadas	117
<b>Tabla 16.</b> Perfil de sensibilidad de las bacterias del ácido láctico a los antibióticos	118
<b>Tabla 17.</b> Espectro de actividad antibacteriana de las sustancias antibacterianas parcialmente purificadas	127

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de fabricación del queso Paipa	18
<b>Figura 2.</b> Clasificación de las bacteriocinas según Heng et al. (2007)	38
<b>Figura 3.</b> Representación de las diferentes técnicas que se utilizan para la purificación de las bacteriocinas	45
<b>Figura 4.</b> Diagrama de flujo de diferentes enfoques utilizados para el estudio de la diversidad bacteriana mediante métodos dependientes e independientes de cultivo	63
<b>Figura 5.</b> Diversidad bacteriana de muestras de queso Paipa a niveles de phylum (a), Familia (b) y género (c)	103
<b>Figura 6.</b> Análisis de componentes principales del microbioma bacteriano del queso Paipa	105
<b>Figura 7.</b> Prevalencia de bacterias patógenas aisladas en el queso Paipa	107
<b>Figura 8.</b> Recuento de BAL en muestras de queso Paipa	110
<b>Figura 9.</b> Bacteria ácido lácticas productoras de sustancias antimicrobianas	111
<b>Figura 10.</b> Análisis filogenético de la cepa QP117 y especies relacionadas el método de neighbor joining	119
<b>Figura 11.</b> Análisis filogenético de la cepa QP63 y especies relacionadas el método de neighbor joining	119
<b>Figura 12.</b> Cinética de crecimiento y de producción de la bacteriocina por la cepa <i>L. mesenteroides</i> QP117	120
<b>Figura 13.</b> Cinética de crecimiento y de producción de la bacteriocina por la cepa <i>L. lactis</i> QP63	121
<b>Figura 14.</b> Purificación de las bacteriocina producida por <i>L. mesenteroides</i> QP117	122
<b>Figura 15.</b> Purificación de las bacteriocina producida por <i>L. lactis</i> QP63	123
<b>Figura 16.</b> Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de los eluidos producidos por las cepas y <i>L. mesenteroides</i> QP117 y <i>L. lactis</i> QP63	124
<b>Figura 17.</b> Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de los eluidos producidos por las cepas y <i>L. mesenteroides</i> QP117 y <i>L. lactis</i> QP63	125
<b>Figura 18.</b> Efecto de las proteasas sobre la actividad antimicrobiana de los eluidos producidos por las cepas <i>L. mesenteroides</i> QP117 y <i>L. lactis</i> QP63	125
<b>Figura 19.</b> Efecto de las sustancias químicas sobre la actividad antimicrobiana de los eluidos	

producidos por las cepas *L. mesenteroides* QP117 y *L. lactis* QP63 126

**Figura 20.** Espectros representativos MALDI-TOF-MS para las sustancias antimicrobianas  
producidas por bacterias aisladas del queso Paipa 129

## **RESUMEN**

El queso Paipa es el único queso tradicional semimadurado elaborado con leche cruda de vaca en Colombia. Alrededor de 70 microempresas producen queso Paipa de los cuales 14 son formalmente legales porque llevan el sello sanitario de calidad y el sello de denominación de origen en su producto. El resto de las microempresas son informales y producen queso de forma artesanal sin los utensilios ni condiciones mínimas estándar de higiene, lo que podría causar enfermedades.

Los estudios sobre los aspectos microbiológicos del proceso de producción de queso Paipa son escasos. Al ser un proceso tradicional basado en la leche cruda, es importante comprender la composición microbiana del queso y las variaciones que pueden ocurrir en este proceso de maduración espontánea que se basa en la microbiota de la materia prima y el entorno de procesamiento, e identificar posibles riesgos microbiológicos.

Algunos estudios indican que el queso Paipa presenta diferentes bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva y coliformes totales. Sin embargo, no se sabe nada de la microbiota total, de los microorganismos no cultivables, ni como varían durante el proceso de maduración. Tampoco se sabe si hay diferencias entre los productores formales e informales con respecto a la calidad sanitaria de los quesos y si el queso contiene bacterias potencialmente patógenas resistentes a los antibióticos y tolerantes a los biocidas.

El desconocimiento de estos aspectos compromete el propósito de llegar a nuevos mercados a nivel nacional e internacional, disminuye la confianza entre los consumidores y por lo tanto la producción y el consumo, generando menos empleo, menores ingresos y por lo tanto menor calidad de vida de los productores y vendedores.

A nivel mundial, se han estudiado diferentes técnicas para reducir las poblaciones de bacterias que provocan enfermedades y se transmiten por los alimentos, una de ellas es el uso de bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos de bajo peso molecular sintetizados por bacterias. Las más estudiadas son las producidas por bacterias del ácido láctico porque

son inofensivos para los seres humanos, no alteran las propiedades de los alimentos, inhiben las bacterias patógenas y/o alteradores a muy bajas concentraciones, pueden acelerar los procesos de maduración, su actividad se potencia con bajos niveles de pH y pueden ser más eficaces en combinación con otros tratamientos.

Así, el objetivo de este trabajo fue obtener información sobre la microbiota del queso Paipa mediante el uso de un enfoque dependiente e independiente de cultivo, determinar la calidad del queso Paipa producido por empresas formales e informales, aislar y caracterizar las bacterias potencialmente patógenas (coliformes, *S. aureus* y *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp.), determinar su susceptibilidad a los antimicrobianos y su tolerancia a los biocidas. Este estudio también pretendió seleccionar y caracterizar bacterias ácido lácticas con actividad bacteriocinogénica contra los potenciales patógenos aislados del queso Paipa, además de caracterizar y purificar los compuestos antimicrobianos.

Para ello en primer lugar se muestrearon dos lotes de queso Paipa de tres productores formales durante el proceso de maduración de 28 días. El ADN total de las muestras de queso se utilizó para obtener secuencias del gen ribosómico 16S (ARNr 16S) utilizando la tecnología Illumina.

Los resultados indicaron que *Firmicutes* fue el principal phylum encontrado en los quesos (abundancias relativas: 59,2–82,0%), seguido de *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*. *Lactococcus* fue el género principal, pero también se detectaron otras bacterias del ácido láctico (*Enterococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*). *Staphylococcus* también fue relevante en algunas muestras de queso. Las *Proteobacterias* más importantes fueron *Enterobacteriaceae*, *Aeromonadaceae* y *Moraxellaceae*. *Enterobacter* y *Enterobacteriaceae* (otros) se detectaron en todas las muestras de queso. *Serratia* y *Citrobacter* fueron detectados en algunas muestras. *Aeromonas* y *Acinetobacter* también fueron relevantes. Otros géneros menores detectados fueron *Marinomonas*, *Corynebacterium* y *Chryseobacterium*. El análisis de coordenadas principales sugirió que había diferencias dependientes del productor en la microbiota de los quesos Paipa.

En segundo lugar, se determinaron concentraciones viables de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, coliformes totales y fecales, *Salmonella* sp., *L. monocytogenes* y *Staphylococcus* sp., en quesos comercializados por empresas formales e informales en la ciudad de Paipa, Boyacá, Colombia. Se aislaron bacterias de los grupos indicadores coliformes, *Staphylococcus* sp. y *Listeria* sp. Todos los aislados fueron identificados mediante la secuenciación del gen ARNr 16S. Luego a estos aislamientos se les determinó la susceptibilidad a antibióticos y biocidas.

Los resultados indicaron que el 100% de las muestras (n=16 muestras) de productores formales e informales presentaron poblaciones de coliformes totales y fecales y *Staphylococcus* sp. por encima de los límites establecidos por la normativa colombiana. Los resultados también indicaron que el 56% de los aislados de *Staphylococcus* fueron *S. aureus*. *L. monocytogenes* fue positivo en el 38% de las muestras. *Salmonella* sp., no se detectó. Los coliformes más abundantes fueron *Escherichia coli* (22%), *Citrobacter freundii* (22%) y *Proteus mirabilis* (14%). Todas las *L. monocytogenes* (100%) fueron sensibles a los antibióticos. La mayoría de los *S. aureus* aislados fueron susceptibles a los antibióticos ensayados, excepto a la tetraciclina y la eritromicina (7% de resistencia). Del mismo modo, el 30% de los coliformes (n=36), fueron multirresistentes a los antibióticos, pero susceptibles a los biocidas.

En tercer lugar, se realizó el recuento de placa y el aislamiento de bacterias ácidas lácticas en el agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Las bacterias del ácido láctico fueron seleccionadas por actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* sp. y coliformes. Los resultados indicaron que dos aislados (n=250) mostraron actividad contra cepas de *L. monocytogenes*, y uno contra cepas de *S. aureus* de las colecciones española, americana y colombiana de cultivos tipo. Ninguna inhibió a coliformes ni a *Salmonella* sp.

Los dos aislados QP117 y QP63 fueron identificados por sus secuencias ARNr 16S como *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus lactis*, respectivamente. *L. mesenteroides* creció a 45°C mientras que *L. lactis* creció a 42°C. Ambas cepas toleraron

concentraciones de NaCl del 4% y un pH entre 4 y 9. *L. mesenteroides* demostró resistencia a la estreptomicina, kanamicina, carbenicilina, oxacilina y estreptomicina, mientras que *L. lactis* fue resistente a la vancomicina, kanamicina, oxacilina y carbenicilina.

Las cepas *L. mesenteroides* QP117 y *L. lactis* QP63 se cultivaron al 2% en caldo MRS (volumen final 10 L) a 30°C durante 16 y 24 h respectivamente. Posteriormente, los compuestos antimicrobianos fueron purificados por cromatografía de intercambio catiónico y caracterizados por su espectro de acción contra diferentes cepas bacterianas, su resistencia a la temperatura, el pH y la presencia de sustancias químicas.

Los resultados indicaron que los compuestos antimicrobianos de ambas cepas son sensibles a proteasas, resisten altas temperaturas (121°C durante 15 minutos a 15 libras de presión), diferentes valores de pH (2-9) y no son afectados por la presencia de sustancias químicas como NaCl, urea, tween, y dodecil sulfato de sodio (SDS). Los compuestos antimicrobianos muestran una fuerte actividad anti-listeria, y también presentan actividad contra *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus faecium* ATCC 33667 y *Lactobacillus casei* ATCC 393.

Por último, se determinó el peso molecular de las sustancias antibacterianas mediante MALDI-TOF MS (desorción/ionización con láser asistida por matriz con tiempo de vuelo y detección de masa).

Los espectros MALDI-TOF MS de los eluidos cromatográficos de *L. lactis* QP63 determinaron tres picos específicos (1299,818, 1947,235, 5938,94 masa/carga), uno de ellos en el rango de la lacticina Q (5917,05) y lacticina Z (5959,09) de *L. lactis* QU 14.

*L. mesenteroides* QP117 también presentó tres picos específicos (1284,277, 2027,756 y 3497,558 masa/carga), uno de ellos muy similar a la leukocina B (3484.5/carga de masa) de *L. mesenteroides* TA33a.

Los resultados sugieren que las sustancias antimicrobianas producidas por *L. lactis* QP63 y *L. mesenteroides* QP117 son bacteriocinas de bajo peso molecular con gran potencial para ser utilizadas en la mejora de la calidad sanitaria del queso Paipa.

## **SUMMARY**

Paipa cheese is the only traditional semi-mature cheese made with raw cow's milk in Colombia. About 70 micro-enterprises produce Paipa cheese, of which 14 are formally legal because they bear the quality health seal and the origin denomination seal on their product. The rest of the micro-enterprises are informal and produce cheese by hand without the utensils or minimum standard hygiene conditions, which could cause disease.

Studies on the microbiological aspects of the Paipa cheese production process are scarce. Some studies indicated that Paipa cheese has different pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* coagulase-positive, and total coliforms. However, it is not about the total microbiota of non-cultivable microorganisms, nor as they vary during the maturation process. It is also not known whether there are differences between formal and informal producers regarding the health quality of cheeses and whether cheese contains potentially antibiotic-resistant and biocidal-tolerant bacteria.

Lack of knowledge of these aspects compromises the purpose of reaching new markets at the national and international levels, decreases trust among consumers and therefore production and consumption, generating less employment, lower incomes, what it entails the lower quality of life for producers and sellers.

Globally, different techniques have been studying to reduce populations of bacteria that transmit foodborne illness, one of which is the use of bacteriocins. Bacteriocins are low molecular weight peptides synthesized by bacteria. The most studied are those produced by lactic acid bacteria because they are harmless to humans. They do not alter the properties of food, inhibit pathogenic at low losses, they can accelerate maturation processes, their activity is potency at low pH levels, and maybe further modifications in combination with other treatments.

Until now, bacteriocin-producing lactic acid bacteria in Paipa cheese have not been investigated. Thus, the objective of this work was to obtain information on the microbiota of Paipa cheese through the use of a dependent and independent culture approach, determine the quality of Paipa cheese produced by formal and informal enterprises, isolate

and characterize potentially pathogenic bacteria (coliforms, *S. aureus*, and *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp.), determine their susceptibility to antimicrobials and their tolerance to biocides. The purpose of this study was also to isolate, select, and identify lactic acid bacteria from Paipa cheese with bacteriocinogenic activity against the potential pathogens isolated from Paipa cheese, in addition to purifying and characterizing the antimicrobial compounds.

In the first place, two batches of Paipa cheese from three formal producers were sampled during the 28-days maturation process. The total DNA from the cheese samples was used to obtain 16S rRNA gene sequences using Illumina technology.

The results indicated that *Firmicutes* was the main phylum found in cheeses (relative abundances: 59,2–82,0%), followed by *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Bacteroidetes*. *Lactococcus* was the main genus, but other lactic acid bacteria (*Enterococcus*, *Leuconostoc*, and *Streptococcus*) were also detected. *Staphylococcus* was also relevant in some cheese samples. The most important *Proteobacteria* were *Enterobacteriaceae*, *Aeromonadaceae*, and *Moraxellaceae*. *Enterobacter* and *Enterobacteriaceae* (others) were detected in all cheese samples. *Serratia* and *Citrobacter* were detected in some samples. *Aeromonas* and *Acinetobacter* were also relevant. Other minor genera detected were *Marinomonas*, *Corynebacterium*, and *Chryseobacterium*. The principal coordinate analysis suggested that there were producer dependent differences in the microbiota of Paipa cheeses.

Secondly, viable concentrations of mesophilic aerobes, molds and yeasts, total and fecal coliforms, *Salmonella* sp., *L. monocytogenes*, and *Staphylococcus* sp., were determined in cheeses sold by formal and informal enterprises in the city of Paipa, Boyacá, Colombia. The bacteria of the coliform indicator groups, *Staphylococcus* sp., and *Listeria* sp., were isolated. All isolates were identified by sequencing the 16S rRNA gene. Then, these isolates were determined to be susceptible to antibiotics and biocides. The results indicated that 100 % of the samples (n = 16 samples) from formal and informal producers presented populations of total and fecal coliforms and *Staphylococcus* sp., above the limits

established by Colombian regulations. The results also indicated that 56 % of the *Staphylococcus* sp., isolates were *S. aureus*. *L. monocytogenes* was positive in 38 % of the samples. *Salmonella* sp., was not detected. The coliforms that prevailed were *Escherichia coli* (22 %), *Citrobacter freundii* (22 %), and *Proteus mirabilis* (14 %). All *L. monocytogenes* (100 %) were sensitive to antibiotics. The *S. aureus* were susceptible to antibiotics, except for tetracycline and erythromycin (7 % resistance). Similarly, 30% of coliforms (n = 36) were multiresistant to antibiotics but susceptible to biocides.

In third place, was performed plaque counting and isolation of bacteria acid lactic on De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS). Lactic acid bacteria were selected by antimicrobial activity against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* sp., and coliforms. The results indicated that two isolates (n = 250) showed activity against *L. monocytogenes* strains, and one against *S. aureus* strains from the Spanish, American and Colombian collections. None inhibited coliforms and *Salmonella* sp.

The two isolates QP117 and QP63 were identified by 16S rDNA sequencing as *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactococcus lactis*, respectively. *L. mesenteroides* grew at 45 °C while *L. lactis* grew at 42 °C. Both bacteria tolerated concentrations of 4 % NaCl and a pH between 4 and 9. On the other hand, *L. lactis* grew at 42°C and tolerate 6.5% NaCl. *L. mesenteroides* demonstrated resistance to streptomycin, kanamycin, carbenicillin, oxacillin, and streptomycin, while *L. lactis* was resistant to vancomycin, kanamycin, oxacillin, and carbenicillin.

The *L. mesenteroides* QP117 and *L. lactis* QP63 strains were cultivated at 2% in MRS broth (final volume 10 L) at 30° C for 16 and 24 h respectively. Subsequently, the antimicrobial compounds were purified by cation exchange chromatography and characterized by its spectrum of action against different bacterial strains, its resistance to temperature, pH, the presence of chemical substances.

The results indicated that the antimicrobial compounds of both strains are sensitive to proteases, resist high temperatures (121°C), different pH values (2-9) and are not

affected by the presence of chemical substances such as NaCl, urea, tween, and sodium dodecyl sulfate (SDS). The antimicrobial compounds have a strong anti-listeria activity, they also have activity against *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus faecium* ATCC 33667, and *Lactobacillus casei* ATCC 393.

Finally, the molecular weight of antibacterial substances was determined by matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass detection (MALDI-TOF MS).

The MALDI-TOF MS spectra of the *L. lactis* QP63 chromatographic eluates determined three specific peaks (1299.818, 1947.235, 5938.94 mass/charge), one of them in the range of lacticin Q (5917.05 mass/charge) and lacticin Z (5959.09 mass/charge) of *L. lactis* strain QU 14. *L. mesenteroides* QP117, also presented three specific peaks (1284.277, 2027.756 and 3497.558 mass/charge), one of them very similar to leukocin B (3484.5 mass/charge) of *L. mesenteroides* strain TA33a.

The results suggest that the antimicrobial substances produced by *L. lactis* QP63 and *L. mesenteroides* QP117 are low molecular weight bacteriocins with great potential to be used in improving the sanitary quality of Paipa cheese.

## **INTRODUCCIÓN**

## **I.- El queso**

El queso es el producto obtenido por coagulación de leche, de la crema de leche, de la crema de suero, del suero de la mantequilla o de la mezcla de algunos o todos estos productos, por la acción del cuajo u otros coagulantes aprobados (FAO, 2020; INVIMA, 1986). Se dice, que la creación del queso se hizo de forma fortuita y accidental por un pastor, al quien le debió fermentar la leche, se le coaguló y por curiosidad, con la ayuda de un poco de sal y los agentes naturales climatológicos empezó a experimentar, hasta conseguir crear el primer queso. Sin embargo, Kindstedt indica que los orígenes del queso se remontan a la región fértil en el norte de Arabia, donde los cambios en el clima y la intervención del hombre afectaron el suelo, los seres humanos no pudieron seguir cultivando la tierra y se dedicaron al pastoreo de cabras, ovejas. Ante la hambruna, los pastores de ovejas dejaron la leche en una olla de cerámica, observaron que la leche se coaguló, probaron el producto y notaron que era más tolerable a sus estómagos que la leche cruda (Kindstedt, 2012).

### **I.1.- El queso y su consumo a nivel mundial**

Hoy en día Estados Unidos es el mayor productor de queso del mundo, seguido de Alemania y Francia. Islandia es el país que más queso consume por persona/año (30,8 kilos). El segundo y tercer puesto son países europeos mediterráneos, específicamente Grecia (25,5) y Francia (23,7) seguidos de Austria (23,3), Italia (23,1), Finlandia (23,1), Alemania (21,7), Dinamarca (19,8), Suecia (19,8), Suiza (19,8), Bélgica (18,8) y Países Bajos (17,7). Según esta estadística, el consumo de queso per cápita en España se sitúa en 8,9 kilogramos por persona/año, lo que provoca que España esté en trigésimo séptima posición mundial, por debajo de la mayor parte de los países europeos (Oviespaña, 2019).

En América, los Estados Unidos y Argentina tienen un consumo de 15 kg por persona/año. Chile y Venezuela alcanzan niveles de 4 kilos; Brasil y México solo llegan a los 2 kilos. En Colombia el consumo de queso alcanzó los 1,5 kilogramos, ocupando el puesto 50 a nivel mundial (Portafolio, 2019).

## I.2.- Tipos de quesos a nivel mundial

Los quesos pueden clasificarse según el tipo de leche, el proceso de maduración, el contenido de humedad, el contenido de grasa, si tienen sello de denominación de origen.

Para la fabricación de los quesos se ha utilizado diferentes tipos de leche como la leche de vaca, de oveja, de cabra, de búfala, o mezcla de dos o tres de las leches, pues cada una tiene sus características y su sabor. Las vacas producen más leche que las ovejas y las cabras. Los quesos hechos con este tipo de leche son más económicos y también más populares. La leche de vaca tiene menos contenido en grasa que otras leches y posee un sabor cremoso y suave, apto para todo tipo de paladares (FAO, 2020).

Los quesos también pueden clasificarse según el contenido de materia grasa sobre el extracto seco (%G/ES) en extragrasso (>60%), graso (entre 45-60%), semigraso (entre 25-45%), semidesnatado (entre 10 y 25%) y desnatado o light (<10%) (Tot Formatge, 2020; FAO, 2006).

Según el proceso de maduración los quesos pueden clasificarse en fresco, tierno, semimadurado y madurado. El queso fresco es el producto higienizado sin madurar, que después de su fabricación está listo para el consumo. El queso tierno es aquel que tiene un proceso de maduración de siete días. El queso semimadurado o semicurado, es el producto higienizado que después de su fabricación se mantiene un tiempo mínimo de 20 a 35 días si pesa más de 1,5 kg (según el país), en condiciones ambientales apropiadas para que se produzcan los cambios bioquímicos y físicos característicos de este tipo de queso. El queso madurado o curado es el producto que después de su fabricación permanece un tiempo determinado en condiciones ambientales apropiadas para que se produzcan los cambios bioquímicos y físicos característicos de este tipo de quesos. Según como sea de largo este periodo podemos diferenciar entre curados, viejos y añejos. Los curados necesitan alrededor de 45 a 105 días, los viejos unos 180 y los añejos un total de nueve meses o más (Tot Formatge, 2020).

Los quesos también pueden clasificarse si tiene o no denominación de origen protegida (DOP). En 1992 la Unión Europea adoptó el Reglamento 2081/92 (sustituido por el 510/2006) referido a la protección de las denominaciones de origen de los productos agrícolas o alimenticios, incluidos los quesos.

La denominación de origen es un sello que sirve para distinguir un producto cuya calidad o características se deben exclusivamente al medio geográfico. El medio geográfico involucra factores naturales, humanos y culturales. Se sabe que el tipo de leche (vaca, oveja, cabra, camella, búfala), la clase de la leche (más grasa o menos debido a los pastos del terreno), el clima (cada región imprime una marca especial o una diferencia en el tipo de queso), las prácticas artesanales, utilizadas en la coagulación, la maduración, la fermentación, definen el tipo de queso (Consejo de la Unión Europea, 2006).

Las Denominación de Origen Protegida (D.O.P.) protege la tradición y la experiencia acumulada a lo largo de los años, por ejemplo, el cambio de una de las materias primas, el reemplazo de una o varias etapas del proceso por técnica industrializadas, evitando las posibles copias del producto. También promueve la confianza de los consumidores en la calidad de los quesos, porque protege y autentifica la elaboración de los mismos, genera capital humano capacitado en la elaboración de productos calificados. También generan ganancias económicas importantes en la comercialización y exportación de productos y ayuda en el desarrollo de tecnologías viables para la producción sustentable y sostenible (SIC-Colombia, 2011; Consejo de la Unión Europea, 2006).

#### I.2.1.- Quesos artesanales con denominación de origen elaborados con leche de vaca cruda

Existen más de 2000 variedades de queso a nivel mundial. Alrededor de 400 variedades se producen solo en Francia, 46 quesos tienen denominación de origen y solo 17 son madurados elaborados únicamente con leche de vaca cruda. Los más vendidos han sido Cantal, el Comté, Reblochón, Roquefort. Entre los más famosos se encuentra el queso

Camembert. El queso Camembert es un queso elaborado con leche de vaca en la región de Normandía (Quesos.es, 2020a). En Francia son infaltables los quesos en la mesa, además de ser reconocidos en todo el mundo (Tabla 1).

En Grecia se elaboran 21 quesos con denominación de origen., 13 de ellos son quesos elaborado únicamente con leche de cabra. El queso Feta, es el queso de cabra más reconocido y es el que más se consume en Grecia. Solo dos quesos son elaborados con leche de vaca, el Graviera de la isla de Naxos que únicamente se elabora con leche de vaca y el San Michalis de la zona de Metsovo, el cual es una mezcla de leche de vaca y oveja (Quesos.es, 2020b).

En Italia existen 33 tipos de quesos con denominación de origen. De esos solo 12 se elaboran únicamente con leche cruda de vaca y son sometidos a un proceso de maduración. Los otros son de cabra, oveja, búfala o sus mezclas. Dentro de estos quesos se destaca el parmesano (Quesos.es, 2020c) (Tabla 1).

El tipo de queso que más se consume en España es el queso fresco, seguido del semicurado y el queso fundido. En España existen 28 quesos con denominación de origen, de los cuales 6 son madurados y se elaboran únicamente con leche cruda de vaca cruda. Estos quesos españoles se concentran en la cornisa Cantábrica, en la denominada España verde, aunque también hay otros quesos madurados elaborados con leche de vaca en otras comunidades autónomas de España (ABCGastronomía, 2020).

**Tabla 1.** Quesos artesanales madurados elaborados únicamente con leche cruda de vaca con denominación de origen en Francia, Italia y España

Nombre	País	Región	Maduración*
Abondance	Francia	Abondance	12
Beaufort	Francia	Saboya	20-48
Bleu de Gex	Francia	Jura, Ain	8-12
Brie de Meaux	Francia	Isla de Francia	4-8
Camembert	Francia	Normandía	3-5
Chource	Francia	Champaña-Ardenas	2-4
Comté	Francia	Franco-Condado	16
Époisses de Bourgogne	Francia	Borgoña	4-8
Laguiole	Francia	Mediodía-Pirineos	16
Langres	Francia	Ardenas, Langres	5
Livarot	Francia	Normandia	6-8
Maroilles	Francia	Hauts-de-France	2-16
Morbier	Francia	Morbier	5-6
Neufchâtel	Francia	Normandía	8-10
Pontl'Évêque	Francia	Normandía	4-6
Reblochon	Francia	Thônes	6-8
Tome des Bauges	Francia	Bauges	5
Asiago	Italia	Véneto y Trentino	32-96
Castelmango	Italia	Valle de Grana	24
Formai de Mut dell'Alta Valle Brembana	Italia	Lombardía	5- 46
Grana Padano	Italia	Llanura del Po	32-96
Montasio	Italia	Friuli-Venecia Julia	8
Monte Veronese	Italia	Véneto	8
Parmigiano Reggiano punto bajo	Italia	Parma	48
Provolone Val Padana	Italia	del Po, en Lombardía	16
Quartirolo Lombardo	Italia	Lombardía	4
Ragusano	Italia	Sicilia y noto	24
Spessa delle Giudicarie	Italia	Trentino-Alto Adigio	12-24
Stelvio	Italia	Trentino-Alto Adigio	8
Afuega'lPitu	España	Asturias	8
Arzúa-Ulloa curado	España	Galicia	24
Casín	España	Asturias	8
Nata de Cantabria	España	Cantabria	1
San Simón da Costa	España	Galicia	5-6
Mahón-Menorca tierno	España	Islas Baleares	4 a 8

\* La maduración es en semanas

En América latina igual que en España el tipo de queso que más se consume es el queso fresco. Países como México, Argentina y Brasil, producen una gran variedad de quesos, pero ninguno está protegido con denominación de origen. En Costa Rica el queso que tiene denominación de origen es el Turrialba (Granados y Álvarez, 2007).

En Colombia se producen 12 variedades de quesos: la cuajada, el queso campesino, el queso costeño, el quesito Antioqueño, el queso molido Nariñense, el queso Doble Crema, el quesillo Tolimense y Huilense, el queso Pera, el queso Caquetá, el Quesadillo y el queso Paipa, los cuales son elaborados en las diversas regiones de Colombia y hacen parte de la oferta gastronómica con la que cuenta la nación (Contextoganadero, 2016).

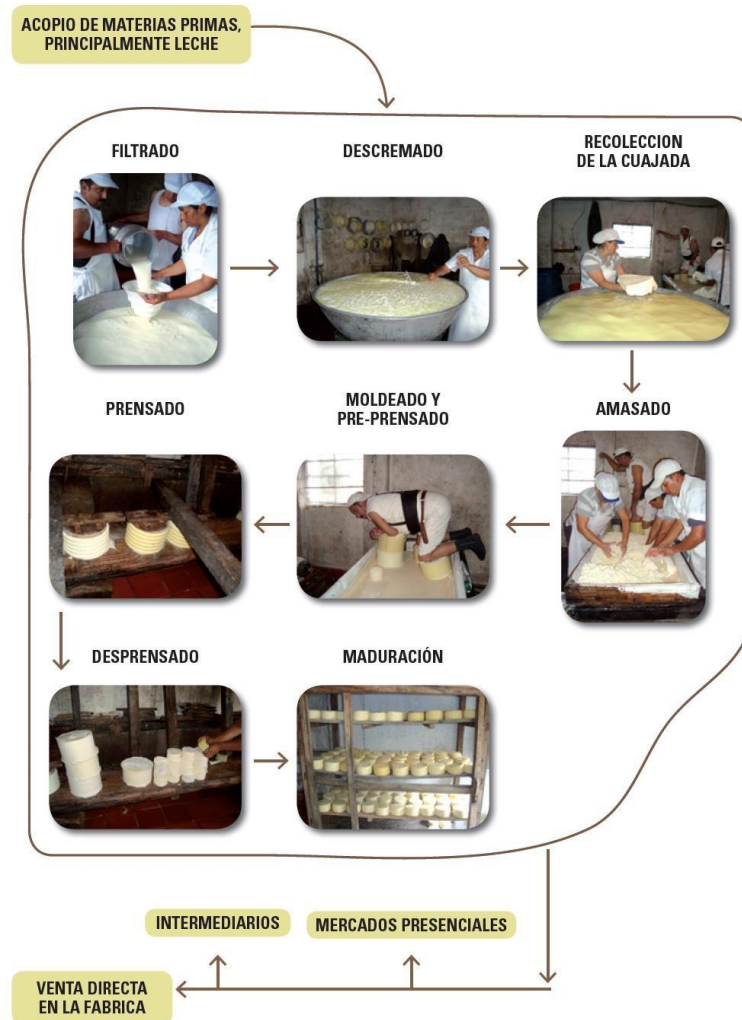
#### I.2.1.1.- El queso Paipa

El queso Paipa es el único queso semicurado que se produce en Colombia. Es elaborado con leche cruda de vaca por pequeños productores de los municipios de Paipa y Sotaquirá, región noroccidental del Departamento de Boyacá, Colombia, localizada entre los 5°68' y 5°97' de latitud norte y los 73°00' y 73°33' de longitud oeste del meridiano de Greenwich a unos 2525 msnm, temperatura promedio de 14°C y una humedad relativa del 71% (Robayo & Pachón, 2013).

El queso Paipa ha recibido la denominación de protección (DPO) por la normativa colombiana (SIC-Colombia, 2011). Es producido por unas 70 microempresas, de las cuales 15 son formalmente legales (también conocidas como productores formales), con sello de registro sanitario y sello de calidad de denominación de origen.

La producción de queso Paipa se basa en la experiencia artesanal de los queseros, transmitidos de generación en generación. El queso se elabora sin la adición de cultivos iniciadores. Después de la recolección de la leche, la crema flotante o nata se retira manualmente y la leche se coagula enzimáticamente. El amasado, prensado y moldeo se llevan a cabo manualmente de acuerdo con un proceso tradicional en el que las manos, puños y codos de los queseros entran en contacto con la cuajada de queso. Se permite que

el queso madure en estantes de madera a temperatura ambiente (que pueden oscilar entre 12 y 20°C), a una humedad relativa del 60-80%. El tiempo de maduración estándar (21 días) puede ampliarse hasta 28 días (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema de fabricación del queso Paipa (tomado de Robayo & Pachón, 2013)

El queso Paipa se caracteriza por presentar un contenido de grasa de 21,5 %, grasa en materia seca 40,4 %, humedad 47,3 %, humedad en queso desengrasado 60,4 %, sólidos totales 52,6 %, proteína 24,3 %, contenido de sal 2,1 %, acidez 1,8-2,1 % y pH 5,21. También presenta calcio, fósforo, vitamina A, B2 y D, lo que demuestra sus grandes características nutritivas (Robayo & Pachón, 2013). Presenta un sabor entre ácido y amargo suave, un color amarillo pálido, levemente suave y aroma rancio fuerte, con una corteza algo corrugada que puede llegar a medir 5 mm de espesor y textura semidura,

seca. Generalmente se comercializa por libras tradicional cilíndrica de 15 cm, aunque también lo comercializan de 2, 4, 10 y 25 libras según requerimiento del cliente (SIC-Colombia, 2011).

Son pocos los estudios microbiológicos realizados al queso Paipa. En el año 2006, determinaron por métodos tradicionales dependientes de cultivo, concentraciones de coliformes que llegaron alcanzar  $3,2 \times 10^5$  UFC/mL, *S. aureus* de  $1,9 \times 10^5$  UFC/mL, presencia de *Salmonella* sp., y *Listeria* sp. (Neira & de Silvestri, 2006). Estos microorganismos también fueron encontrados en la materia prima con la que se elaboró el queso.

En otro estudio, se determinó que durante el tiempo de maduración (1, 10, 20 y 30 días), los recuentos de aerobios mesófilos y *S. aureus* disminuyeron de  $>3,0 \times 10^8$  UFC/g a  $2,8 \times 10^3$  UFC/g y de  $3 \times 10^5$  UFC/g a  $4,5 \times 10^1$  UFC/g respectivamente. Sin embargo, las poblaciones de coliformes totales no disminuyeron manteniéndose  $4 \times 10^4$  UFC/g y  $1,2 \times 10^2$  UFC/g respectivamente. También se evidenció que solo después de los 30 días de maduración *Salmonella* sp., y *Listeria* sp. fueron inhibidas, indicando que los quesos no se deben comercializar antes de los 30 días de maduración, tal como lo reglamenta el ministerio de salud de Colombia para quesos madurados (Fadul & Quecano, 2005).

El queso Paipa solo se ha analizado mediante técnicas no cultivables, así que no se tiene conocimiento sobre la biodiversidad bacteriana, que especies bacterianas son las que dominan la fermentación del queso, como varían los grupos microbianos con los tiempos de maduración, que otros microbianos cultivables y no cultivables, están presentes en el queso. Tampoco se tiene conocimiento si hay diferencias en la calidad sanitaria de los quesos entre los productores formales e informales. No se ha determinado si las cepas potencialmente patógenas son resistentes a los antibióticos y a los biocidas, lo cual agrava el problema. Tampoco se han estudiado el potencial de las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en el queso, como por ejemplo la capacidad para producir bacteriocinas.

## II.- Microbiología de los quesos artesanales madurados

La microbiota de los quesos está influenciada por múltiples factores como la geografía de la región, la topografía, el clima, los factores agrícolas, la raza de los animales, el tipo de leche, las prácticas de ordeño, la salud del animal, el tratamiento que se le hace a la leche, las prácticas higiénicas durante el proceso de fabricación, el proceso de maduración. Todas estas prácticas son responsables de su calidad y desempeña un papel importante en el desarrollo del sabor, la apariencia y la textura del queso (Abdel- Hameid et al., 2019; Bogsan et al., 2015).

Se ha determinado que los quesos elaborados con leche cruda presentan una gran diversidad de bacterias pertenecientes a diferentes filos (*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*. El filo *Firmicutes* domina el ecosistema microbiano de la leche pasteurizada y la leche cruda (entre el 81-84%), seguido de *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* respectivamente (Quigley et al., 2013).

### II.1.- Bacterias que provocan enfermedades por consumo de queso artesanal

Los quesos artesanales elaborados con leche cruda sin cultivos iniciadores, se basan en la fermentación de los azúcares principalmente por la microbiota nativa beneficiosa y no siempre logran desplazar a otras poblaciones microbianas que pueden suponer riesgos para la salud humana (Abdel-Hameid et al., 2019; Herrera et al., 2016).

Según la normativa colombiana, a los quesos semi-madurados se les debe realizar periódicamente recuentos de microorganismos indicadores entre los que se encuentran *Staphylococcus* sp., coliformes, *L. monocytogenes* y *Salmonella* sp. (Tabla 2).

**Tabla 2.** Requisitos microbiológicos para queso madurados

Requisito	N	M	M	c
Recuento de coliformes totales 30°C (UFC/g)	3	100	1000	1
Recuento de coliformes fecales 45°C (UFC/g)	3	10	100	1
Recuento <i>Staphylococcus</i> coagulasa positiva UFC/g	3	100	1000	1
<i>Salmonella</i> /25g	3	0		0
<i>Listeria monocytogenes</i> /25g	5	0	–	0

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.

**Fuente:** (INVIMA, 1986)

### II.1.1.- Coliformes

Los coliformes son bacterias que pertenecen al filo *Proteobacteria*, clase *Gamma Proteobacteria*, orden *Enterobacteriales*, familia *Enterobacteriaceae*. Son bacterias en forma de bacilo, Gram negativos, oxidasa negativa, capaces de fermentar lactosa, con producción de gas en 48 h a una temperatura de 37 °C. Dentro de los coliformes totales existe un subgrupo denominado coliformes fecales. Los coliformes fecales son bacterias que habitan en el intestino de los seres humanos y de los animales de sangre caliente, por lo cual se ha catalogado como indicador de contaminación fecal del agua, del suelo y de los alimentos. Se diferencia de los coliformes totales porque son capaces de fermentar la lactosa con producción de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 44°C (APHA et al., 2012). Al grupo de los coliformes fecales pertenecen los géneros bacterianos *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., (APHA et al., 2012; Madigan et al., 2010). No

obstante, solo algunos serotipos de *Escherichia coli* causa enfermedad por consumo de alimentos son. Los géneros *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., son bacterias implicadas en infecciones nosocomiales (PAHO, 2020). Los serotipos de *E. coli* son enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC). Se caracterizan porque se transmiten por consumo de agua o alimentos contaminados con materia fecal, como cárnicos poco cocidos o consumo de leche cruda o quesos artesanales producidos con leche cruda. También se puede transmitir por vegetales contaminados. Su principal síntoma es la diarrea aguda, también puede aparecer cólico, fiebre y vómito. Afecta principalmente a niños menores de 5 años, adultos de 65 años o mayores, personas inmunosuprimidas, mujeres embarazadas, personas que viajan a ciertos países. Los síntomas generalmente duran de 3 a 8 días. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de 10 días, aunque en algunos casos la enfermedad puede causar la muerte. *E. coli* O157:H7 es el principal serotipo de *E. coli* enterohemorrágica. Se diferencia de las demás porque no crece a 44°C y no tiene la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. Puede causar una diarrea sanguinolenta con calambres abdominales intensos (colitis hemorrágica) que luego se puede convertir en el síndrome urémico hemolítico, el cual se caracteriza por una insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia (deficiencia de plaquetas) La enfermedad producida por los serotipos de *E. coli* es autolimitada. No se recomienda el uso de antibióticos. Solo reposición de líquidos y electrolitos (WHO, 2018a; Elbagory et al., 2016). Para la determinación de estas bacterias se realiza recuento en placa en agar cromogénicos y fluorogénicos selectivos para coliformes y NMP/g en caldo LMX fluorocult. Los aislamientos bacterianos luego son identificados por pruebas serológicas o moleculares (PCR).

### II.1.2.- *Shigella* sp.

Es una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, pero no fermenta la lactosa. Puede producir disentería bacilar. Las Shiguellas se clasifican en 4 subgrupos: serogrupo A constituido por *S. dysenteriae* (12 serotipos), serogrupo B: *S. flexneri* (14

serotipos), serogrupo C: *S. boydii* (15 serotipos), serogrupo D: *S. sonnei* (1 serotipo), conocida también como *Shigella* del grupo D (PAHO, 2020).

Entre los alimentos implicados se encuentran los derivados lácteos, harina, huevos de almejas, camarones, ostras, clara de huevo, verduras y frutas. La dosis infectiva es de 10 a 100 bacterias. *Shigella* sp. es una bacteria acidófila, por lo cual puede fácilmente soportar la acidez del estómago. Una vez en el intestino se adhiere y penetra en la célula del epitelio intestinal por un proceso tipo fagocitosis y se multiplica. Provoca la muerte celular lo que determina la respuesta inflamatoria característica (ulceración de la mucosa y microabscesos). El período de incubación es de 1-3 días, pero puede prolongarse hasta 7 días. Los síntomas más comunes son diarrea, fiebre, náusea, vómitos, pérdida de apetito, calambres estomacales y otras manifestaciones intestinales. Las heces pueden estar acompañadas de moco y sangre. El diagnóstico de microorganismos se realiza utilizando agares selectivos como agar Salmonella-Shigella, pruebas bioquímicas e identificación molecular por el gen ARNr 16S.

Generalmente la enfermedad es autolimitada. No obstante, puede tener complicaciones porque se puede dar la producción de una toxina denominada toxina Shiga, la cual produce el síndrome urémico hemolítico. Se recomienda aporte hidroelectrolítico de forma oral (PAHO, 2020; Shahin, et al., 2019; Peng et al., 2013).

### II.1.3.- *Salmonella* sp.

Es una bacteria que también pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Se conocen al menos 2500 serotipos. Los que con mayor frecuencia producen enfermedad son *S. enterica* serovariedad *thyphimurium* y *S. enterica* serovariedad *enteritidis* (PAHO, 2020). *Salmonella* sp. es una bacteria que habita principalmente en el intestino de las aves. *Salmonella* sp. llega a los alimentos por contaminación cruzada. Los alimentos implicados son alimentos basados en carne de pollo y vaca, los vegetales, frutas, agua, huevos. La salmonelosis es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes y ampliamente extendidas. El periodo de incubación de la enfermedad es de 6 a 72 h y la

enfermedad puede durar de 2 a 7 días. La dosis infectiva es de  $1 \times 10^3$  UFC/g. Los síntomas principales son la aparición brusca de fiebre, dolor abdominal, diarrea, náusea y, a veces, vómitos, que suele ser un trastorno sin complicaciones y no requiere tratamiento, aunque puede ser grave en los niños, los ancianos y los pacientes inmunodeprimidos. Se recomienda aporte hidroelectrolítico de forma oral (PAHO, 2020).

#### II.1.4.- *Staphylococcus* sp.

Son bacterias que pertenecen al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Bacillales*, familia *Staphylococcaceae*, género *Staphylococcus*. Los estafilococos son bacterias Gram positivas, inmóviles, no esporuladas, de 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Su nombre se les atribuye a las agrupaciones que produce que son similares a racimos de uvas. Son anaerobios facultativos, catalasa positiva, oxidasa negativa (Madigan et al., 2010).

Los estafilococos hacen parte de la microbiota normal de la piel del ser humano, y son halotolerantes. Por lo tanto, pueden propagarse de una persona a otra por contacto directo con la piel del manipulador portador o indirectamente a través de las microgotas salivales, el uso de utensilios contaminados como toallas, ropa, manijas de puertas, el control remoto o por medio de teléfonos móviles. También se puede transmitir a través de los alimentos. Los alimentos asociados a brotes por *Staphylococcus* sp. son los derivados lácteos, principalmente los quesos artesanales elaborados con leche cruda, derivados cárnicos como el jamón, salamis, carnes, sándwiches. También se puede transmitir por postres y ensaladas. La leche cruda tiene un alto riesgo de contaminación durante el ordeño, por la mala manipulación y porque los animales podrían tener mastitis, una infección bacteriana (Adame-Gómez et al., 2018; Kümmel et al., 2016).

Hay más de 30 tipos de estafilococos. Los estafilococos pueden causar diferentes tipos de afecciones, incluyendo infecciones de la piel, en los huesos, bacteremia, endocarditis (enfermedad más grave en humanos), neumonía, síndrome del shock tóxico e intoxicación a nivel alimentario. *S. aureus* coagulasa positivo es la especie más peligrosa causante de la mayoría de las enfermedades. Dentro de las enfermedades más representativas de esta especie son las producidas por toxinas como el shock tóxico y la

intoxicación alimentaria. El síndrome del shock tóxico es una afección potencialmente mortal causada por *S. aureus* coagulasa positivo. Este microorganismo produce la toxina-1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1) la cual pesa 22 kDa. Se caracteriza por actuar como un superantígeno termoestable y resistente a la proteólisis. Esta patología está asociada con la infección de una herida por *S. aureus*. Los síntomas son fiebre, erupción eritrodermatosa, descamación, hipotensión, malestar y confusión que puede desencadenar disfunción multiorgánica (con 3 o más de los siguientes): vómito o diarrea, mialgia severa, insuficiencia renal, hiperemia de las membranas mucosas (Fisher et al., 2018).

*S. aureus* también causa intoxicación a nivel alimentario. Esta intoxicación está asociada a la producción de enterotoxinas. Las enterotoxinas estafilocócicas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas de bajo peso molecular (26-30 kDa). Son solubles en aguas termoresistentes y acidotolerantes. Se conocen 7 serotipos enterotoxigénicos diferentes: A, B, C1, C2, C3, D y E. La enterotoxina A es la más comúnmente asociada al consumo de alimentos. No obstante, la enterotoxina B, D y E se pueden transmitir por derivados lácteos (Bellio et al., 2019; Fisher et al., 2018).

La dosis de toxina que provoca enfermedad es 1-5 µg/g alimento. Esto generalmente se logra cuando las poblaciones de la bacteria alcanzan una población de 10<sup>5</sup> UFC/g. Sin embargo, la Food and Drug Administration (FDA) establece que la sola presencia de grandes cantidades de *S. aureus* no constituye evidencia suficiente para incriminar un alimento como causante de infección. El mecanismo de acción es controvertido. La enterotoxina estafilocócica produce un aumento del peristaltismo intestinal por acción simpaticomimética. También se ha sugerido una acción sobre el sistema nervioso por la intensidad de los vómitos. El periodo de incubación de la enfermedad es de 1-6 h. Los síntomas producidos por la intoxicación estafilocócica son náuseas, vómito, diarrea, dolor estomacal tipo cólico, y deshidratación (PAHO, 2020).

La detección de enterotoxinas en las cepas de *S. aureus* es sencilla y se realiza mediante pruebas con antisueros, pero tienen un costo elevado. Para la identificación de *S. aureus* coagulasa positivo se deben de realizar diluciones seriadas del alimentos y recuento de placa de células viables en agares selectivos y diferenciales con pruebas de

confirmación posterior como la coagulasa y/o la termonucleasa. Las colonias confirmativas (coagulasa y termonucleasa positiva) se asume como productoras de entotoxinas (ISO, 1999).

Los agares más utilizados para la identificación de *S. aureus* en alimentos son salado manitol y Baird Parker. En agar salado manitol crece produciendo colonias cremas con color amarillo a su alrededor por la fermentación del manitol. En agar Baird Parker crece formando colonias negras con halos a su alrededor porque reducen el telurito de potasio a telurio metálico y son capaces de producir una enzima que se llama lecitinasa, la cual degrada la lecitina de la yema de huevo. Los recuentos de *S. aureus* deben de ser confirmados por prueba adicionales. La prueba más común es la prueba de la coagulasa. La coagulasa es una proteína que permite la conversión del fibrinógeno presente en el plasma de la sangre en fibrina. Esto hace que se coagule la sangre. La coagulasa está estrechamente relacionada con la superficie de la bacteria *S. aureus* y puede revestir su superficie con fibrina al entrar en contacto con la sangre, lo cual le da mayor protección contra la fagocitosis y por lo tanto hace que su virulencia aumente. Otra prueba confirmativa es la termonucleasa (ISO, 1999).

Los estafilococos son indicadores de una mala higiene en la manipulación de alimentos. Para su prevención se recomienda lavarse frecuentemente las manos. Si tiene un corte o herida se debe mantener cubierta. Se recomienda cocer bien los alimentos y refrigerarlos a 4°C (PAHO, 2020). La intoxicación alimentaria con *S. aureus* es autolimitada. Se recomienda hidratación (PAHO, 2020).

#### II.1.5.- *Listeria* sp.

Son bacterias que pertenecen al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Bacillales*, familia *Listeriaceae*, género *Listeria* sp. Las listerias son bacterias Gram positivas, no esporógenas, en forma de bastoncitos, no productoras de cápsula. Son aerobias, móviles

y ubicuas. Entre las 6 especies conocidas del género *Listeria* es de destacar especialmente *Listeria monocytogenes* por ser un germen patógeno para el hombre y los animales. *L. ivanovii* es patógeno sólo para animales. *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. welshimeri* son considerados gérmenes inocuos del medio ambiente (PAHO, 2020; Zhu et al., 2017).

*L. monocytogenes* es un patógeno transmitido por alimentos que puede causar abortos, enfermedades gastrointestinales, septicemia y meningoencefalitis. La listeriosis presenta tasas de mortalidad entre el 20 y 30% en niños, ancianos, mujeres embarazadas, personas inmunocomprometidas y personas trasplantadas (WHO, 2018b).

*L. monocytogenes* se distribuye ampliamente en el medio ambiente, incluyendo agua, suelo y vegetación. *L. monocytogenes* tiene capacidad para sobrevivir en diferentes condiciones ambientales extremas; por lo tanto, su crecimiento es difícil de controlar en el sistema alimentario (Zhu et al., 2017; Melo, et al., 2015). Es una bacteria que tiene una elevada resistencia a las condiciones ambientales, puede reproducirse en un rango amplio de temperatura entre +2° y 45°C, resisten concentraciones altas de NaCl (7,5%), vive en pH extremos. Por este motivo es absolutamente necesario el examen de *L. monocytogenes* en alimentos y muestras medioambientales (WHO, 2019).

Los alimentos implicados en la listeriosis comprenden los derivados de la leche, especialmente los quesos artesanales elaborados con leche cruda (Zhu et al., 2017; Rudolf & Scherer, 2001; Soto-Varela et al., 2018; Ocampo et al., 2019; Gallegos et al., 2007), las carnes frías como el salchichón, salami, carne de cerdo asada y refrigerada, pollo, pescado, legumbres, hortalizas (PAHO, 2020).

La contaminación de los alimentos por *L. monocytogenes* puede ocurrir en cualquier paso de la cadena alimentaria de la granja a la mesa. Sin embargo, los brotes de listeriosis generalmente se asocian con el consumo de ensilajes contaminados por el ganado (Zhu et al., 2017). También puede transmitirse por contaminación cruzada al almacenar alimentos crudos y cocidos, y por equipos y utensilios contaminados (WHO, 2020). En España la listeriosis es una enfermedad de notificación obligatoria desde el

2015. Entre los años 2015-2018, se notificaron 8 brotes de listeriosis en España (1369 casos confirmados) (RENAVE, 2018). En el 2019 se presentó el mayor brote presentado en España con 200 casos confirmados, 7 abortos y 3 fallecidos como consecuencia del consumo de productos cárnicos procesados (WHO, 2019).

El período de incubación de la listeriosis es variable (rango 2 a 3 semanas). La dosis infectante para *Listeria* es de 100 UFC/g. Los factores de virulencia los constituyen los antígenos somático (O) y flagelar (H). Se ha identificado 13 serotipos de *Listeria*. Los serotipos más patógenos al humano son 1/2a, 1/2b y 4b (Muñoz et al., 2011). La bacteria atraviesa la barrera intestinal por endocitosis activa de las células epiteliales y es internalizada por los macrófagos gracias a una proteína de superficie, la internalina, que interacciona con el receptor E-cadherina de las células endoteliales y macrófagos e induce la fagocitosis de la bacteria. Sin embargo, sobrevive por acción de la listeriolisina O y las fosfolipasa. Luego esta bacteria puede reproducirse e invadir otras células sin exponerse a la acción de otros componentes del sistema inmune como anticuerpos, neutrófilos o complemento. *L. monocytogenes* es una bacteria con gran capacidad de invasión, puede invadir el sistema linfático y sanguíneo hasta alcanzar el sistema nervioso central. Los síntomas de la enfermedad son gastroenteritis, vómitos, fiebre, confusión, debilidad. (PAHO, 2020).

Para su diagnóstico clínico se realiza la prueba de oxidasa y catalasa, tinción de Gram, se realizan las pruebas de hidrólisis de esculina, fermentación de los azúcares glucosa y maltosa. También se realiza la prueba de CAMP. Para su identificación a partir de los alimentos se tiene que realizar un enriquecimiento en caldo Fraser, con un posterior aislamiento en agar Palcam o agar McBride. Las colonias de color verde oliva con halo negro son presuntivas de *Listeria* sp. Para saber si es *Listeria monocytogenes* lo mejor es confirmar los aislamientos por una prueba inmunocromatográfica o por una prueba molecular como la secuenciación del gen ARNr 16S (ISO, 2017a).

El tratamiento para la listeriosis grave (sepsis, meningoencefalitis) se realiza con la combinación de ampicilina + gentamicina durante 14 días en la sepsis y 14-21 días en

la meningoencefalitis (PAHO, 2020).

## II.2.- Resistencia a los antibióticos y biocidas

El aumento de las cepas patógenas resistentes a los agentes antimicrobianos es una de las mayores amenazas para la salud mundial, la inocuidad de los alimentos y el desarrollo actual (WHO, 2018c). En 2050, se estima que 10 millones de personas en todo el mundo pueden morir cada año debido a la resistencia a los antimicrobianos (O'Neill, 2014; de Kraker et al., 2016). La resistencia a los antibióticos se produce naturalmente, pero el uso indebido de antibióticos como su aplicación sin fórmula médica (automedicación) y su utilización como promotores del crecimiento animal está acelerando el proceso (Romero et al., 2017; Callejas, 2011).

Se ha determinado la presencia de *S. aureus* resistentes a la meticilina en quesos artesanales en Colombia (Herrera et al., 2016), en México (Adame-Gómez et al., 2018), Brasil (Gonzalez et al., 2017) y Egipto (Abdel-Hameid et al., 2019), entre otros. Esta resistencia se debe a la expresión de un gen cromosómico denominado *mecA* que codifica la síntesis de una proteína modificada denominada PBP2a, la cual al cambiar su conformación impide al agente antibacteriano bloquear la síntesis de la pared celular, al no poder unirse a las proteínas de unión a penicilina (PBP) que dirigen el entrecruzamiento de los componentes (glúcidos y péptidos) de la pared celular. El gen *mecA* es portador en un elemento genético móvil denominado casete cromosómico estafilocócico (SCC *mec*). Existen seis tipos de este gen, que se denominan I a VI, y se diferencian por su tamaño molecular y por la presencia de factores determinantes de resistencia adicionales a otros agentes antibacterianos. Las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina a su vez pueden ser multiresistentes a otros antibióticos como fluoroquinolonas, aminoglucósidos, macrólidos, cetólidos, azólidos, clindamicina y tetraciclinas clásicas. También se ha determinado cepas resistentes a la vancomicina (Callejas, 2011).

Según la organización mundial de la salud, bacterias gram negativas de la familia *Enterobacteriaceae* como *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., y *Shigella* sp., son los

géneros bacterianos con mayor número de serotipos resistentes a los antimicrobianos especialmente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (WHO, 2018c). Los antibióticos  $\beta$ -lactámico son un amplio grupo de antibióticos que se caracterizan por presentar un anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura molecular. Entre ellos encontramos las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Son antibióticos que pueden inhibir tanto a bacterias Gram positivas como Gram negativas.

Las enterobacterias, igual que los estafilococos, tienen como mecanismo de resistencia, la alteración de los sitios de acción de los antibióticos, como las proteínas de unión a las penicilinas, pero, además, pueden cambiar la permeabilidad de la membrana externa obstaculizando que lleguen los antibióticos a su sitio de acción. También pueden producir bombas de exporte o de salida las cuales operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior. También pueden producir  $\beta$ -lactamasas. Las  $\beta$ -lactamasas son proteínas capaces de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia (Tafur et al., 2008). Hay dos tipos de  $\beta$ -lactamasas que se destacan, las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC y las de espectro extendido BLEE. Las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC se distinguen de la BLEE porque no son inhibidas por el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam. Así mismo los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos (tipo AmpC), o solo en plásmidos como es el caso de las BLEE, lo que permitiría la transferencia horizontal de genes mediante conjugación a otras especies bacterianas. Además, se ha determinado que el mismo plásmido que porta los genes de BLEE, pueden encontrarse genes que codifican resistencia para otras clases de antibióticos como aminoglucósidos, tetraciclinas y trimetoprim/sulfametoxazol, lo cual puede contribuir a la multiresistencia (Callejas, 2011).

Otro mecanismo que confiere resistencia es la producción de carbapenemasas. Estas enzimas hidrolizan los antibióticos carbapenems. Puede codificarse en el cromosoma o en elementos móviles como los transposones. Algunas de estas enzimas requieren un metal como cofactor para su funcionamiento. Por ello se le llaman metalodependientes. Otras se les ha asignado el nombre de carbapenemasas de serina.

Existen otros tipos de enzimas que confieren resistencia a los aminoglucósidos por transferencias de grupos químicos. Estas enzimas son metilasas, acetil-transferasas, nucleotidiltransferasas y fosfotransferasas (Callejas, 2011; Tafur et al., 2008). Los genes que codifican a estas enzimas también están en plásmidos, por lo cual podría conllevar a la multiresistencia.

De otro lado, se ha demostrado que la exposición sub-inhibitoria a los biocidas por periodos prolongados, genera resistencia a los antibióticos (Wesgate et al., 2016). Los biocidas son sustancias químicas utilizadas para destruir o neutralizar cualquier microorganismo dañino presente en equipos, utensilios y superficies utilizados en la industria alimentaria (European Parliament and Council, 2012). Los principales biocidas utilizado en la industria de alimentos son compuestos a base de cloro, ácido peracético, compuestos de amonio cuaternario y fenoles (Romero et al., 2017).

### II.3.- Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son las más abundantes en los derivados lácteos. Las BAL son bacilos o cocos, Gram positivos, no esporulados, catalasa y oxidasa negativos, anaerobios facultativos, sin embargo, crecen mejor en condiciones microaerofílicas. Producen ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos (Parada et al., 2007). Pertenecen al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*. Las familias que dominan la microbiota de los derivados lácteos son las familias *Streptococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Lactobacillaceae* y *Enterococcaceae* (Quigley et al., 2013). Los principales géneros que conforman estas familias son: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *Streptococcus* (Egan et al., 2016; da Silva et al., 2014) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Bacterias ácido lácticas representativas en la industria de alimentos

<b>Familia</b>	<b>Género</b>	<b>Especies representativas</b>
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp.	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i>
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i> sp., <i>Lactococcus</i> sp.	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ,
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i> sp.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Las BAL son muy importantes en la industria alimentaria por sus propiedades. La mayoría de las BAL tiene el estatus de *Generally Regarded As Safe* (GRAS) y de *Qualified Presumption of Safety* por la Food and Drug Administration (FDA) y la European Food Safety Authority (EFSA), es decir que no causan daño al ser humano. Las BAL mejoran la textura, el sabor y el aroma de los alimentos debido a la actividad enzimática glucolítica, proteolítica y lipolítica. Tienen la capacidad de aumentar la presencia de aminoácidos esenciales y vitaminas B en los alimentos fermentados. Las BAL pueden remover de los alimentos aflatoxinas, taninos y fitatos (Mutukumira et al., 2015). Además, son protectores y conservadores naturales de los alimentos, porque la disminución del pH durante la fermentación, sumado a la producción de peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetoína y bacteriocinas, aumentando su vida útil e impidiendo el crecimiento de bacterias patógenas.

A nivel de género en los quesos madurados dominan especies como *Lactococcus* sp., *Streptococcus* sp. y *Leuconostoc* sp. (Quigley et al., 2013). Las especies importantes desde el punto de vista alimentario ampliamente utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración de derivados lácteos fermentados son *S. thermophilus*, *L. lactis* y *L.*

*mesenteroides*.

*Streptococcus thermophilus* tiene morfología cocoide y se agrupa en cadenas. No forman esporas y no son móviles. Es homofermentativo y puede crecer a 42°C. Presenta  $\alpha$  hemólisis en agar sangre.

*Lactococcus lactis* es una bacteria de morfología cocoide que se agrupa generalmente en pares. No forman esporas y no son móviles. Es homofermentativo, pueden crecer en concentraciones de NaCl del 4%, toleran la acidez y resisten temperaturas de 42°C, pero no crecen a 45°C. No producen hemólisis en agar sangre. (Frece et al., 2014).

*Leuconostoc mesenteroides* generalmente es de morfología cocoide y agrupa en cadenas. Son bacterias heterofermentativas porque producen además de ácido láctico a partir de la lactosa, etanol y CO<sub>2</sub>. Se caracterizan por producir exopolisacáridos como el dextrano. Pueden llegar a ser patógenos oportunistas en personas inmunosuprimidas (Bou et al., 2008). Se caracterizan por resistir la acidez, concentraciones del 4% de NaCl y temperatura de 45°C. Son resistentes a la vancomicina (Castro et al., 2015).

### II.3.1.- Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas

Las bacteriocinas son péptidos bacterianos de síntesis ribosómica producidas de forma natural durante la fermentación. Las bacteriocinas han llamado la atención de la comunidad científica mundial, por el potencial que tiene para ser utilizadas en la conservación de alimentos, principalmente en la producción de alimentos mínimamente procesados, como una alternativa para reemplazar los aditivos químicos. Están constituidas principalmente por aminoácidos cargados positivamente, que pueden interactuar con las membranas celulares de bacterias, inhibiendo su crecimiento (Heng et al., 2007). Se puede decir que todas las bacterias producen al menos una bacteriocina (Favaro et al., 2015).

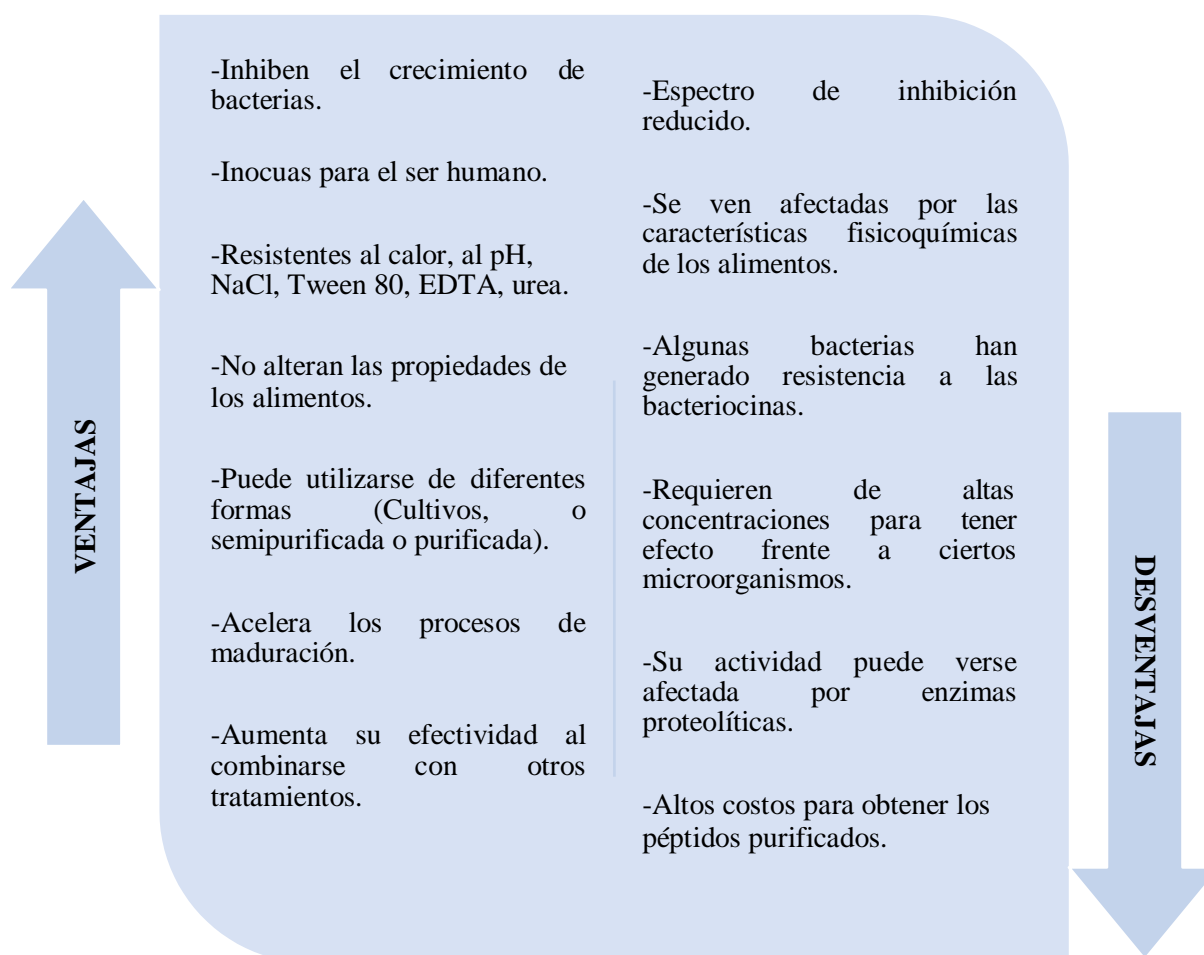
### II.3.1.1.- Ventajas y desventajas de la aplicación de las bacteriocinas en alimentos

Las bacteriocinas de BAL inhiben el crecimiento de bacterias patógenas y alteradores a muy bajas concentraciones (da Silva et al., 2014), son seguras para consumo humano porque al llegar al tracto gastrointestinal son inactivadas por proteasas de origen pancreático y gástrico (tripsina y pepsina). Algunas son resistentes al calor, a la acidez y a sustancias químicas como urea, EDTA, Tween 80, NaCl (Favaro et al., 2015; Egan et al., 2016), no alteran las propiedades sensoriales de los alimentos (Zacharof & Lovitt, 2012) y pueden utilizarse como cultivos iniciadores, o como bacteriocinas semi-purificadas o purificadas. Su actividad se ve potenciada con niveles bajos de pH y pueden llegar a ser más efectivas de manera combinada con otros tratamientos térmicos y no térmicos (Pérez-Pulido et al., 2015). Algunas bacteriocinas, también sugieren la posibilidad de mejorar y potenciar las características de los productos de los que han sido aisladas. Se ha determinado que las bacteriocinas pueden ayudar a acelerar el proceso de maduración de los quesos (Favaro et al., 2015) (Tabla 4).

Sin embargo, las bacteriocinas presentan algunas desventajas. La mayoría de las bacteriocinas no presentan actividad contra bacterias Gram negativas, levaduras, micobacterias y virus (Schirru et al., 2012). Según Grande et al. (2014), las bacterias Gram negativas podrían llegar a ser diez veces más resistentes a las bacteriocinas que las bacterias Gram positivas. La actividad de las bacteriocinas también puede ver afectada por las características fisicoquímicas de los alimentos como el alto contenido de grasa y proteínas. La solubilidad de las bacteriocinas también puede verse afectada por altos valores de pH en los alimentos, como también el uso de aditivos químicos, llegando a inhibir su acción (Favaro et al., 2015). Las bacteriocinas pueden perder su actividad por la producción de enzimas proteolíticas que generan algunos microorganismos degradándolas. Otra desventaja que presenta el uso de bacteriocinas es la generación de resistencia a las bacteriocinas por algunas bacterias (de Freire et al., 2015). Se han reportado casos de resistencia natural o intrínseca y resistencia adquirida (Ennahar & Deschamps, 2000). Estudios relacionados sobre resistencia a las bacteriocinas en *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus bovis*, concluyen

que la resistencia se relaciona con cambios en la pared y membrana celular, como alteraciones en el potencial eléctrico, la fluidez, la carga y la composición de lípidos de membrana o espesor de la pared celular, dificultando así la formación de poros (Mantovani & Russell, 2001) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Ventajas y desventajas del uso de las bacteriocinas



### II.3.1.2.- Clasificación de las bacteriocinas

Heng et al. (2007) clasificaron las bacteriocinas de acuerdo a su mecanismo de acción y características estructurales en:

**Clase I:** Lantibióticos. Son péptidos pequeños (< 5 kDa), policíclicos, estables al calor, activos a nivel de membrana, contienen algunos aminoácidos poco comunes en su composición como lantionina,  $\beta$ -metil-lantionina y dihidroalanina modificados postraduccionalmente; se subdividen en:

**Clase I a:** Péptidos de 2,1 a 3,4 kDa, elongados y catiónicos (2 a 7 cargas positivas). Actúan a nivel de membrana y engloban a los antibióticos de un solo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total.

**Clase I b:** Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos. Tiene un tamaño comprendido entre 1,9 y 2,0 kDa sin carga o cargados negativamente.

**Clase II:** No lantibióticos: bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente en su estructura primaria. Son péptidos pequeños (< 10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la pediocina PA-1, la bacteriocina más estudiada después de la nisina. Este grupo se subdivide en:

**Clase II a:** Tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC (T: tirosina, G: glicina, N: asparagina y V: Valina), muestran una potente actividad inhibitoria frente a *Listeria* spp., y sus representantes característicos son la pediocina PA-1.

**Clase II b:** Formadores de complejos para la formación de poros que contienen dos péptidos diferentes. Los dos péptidos son necesarios para una mejor actividad

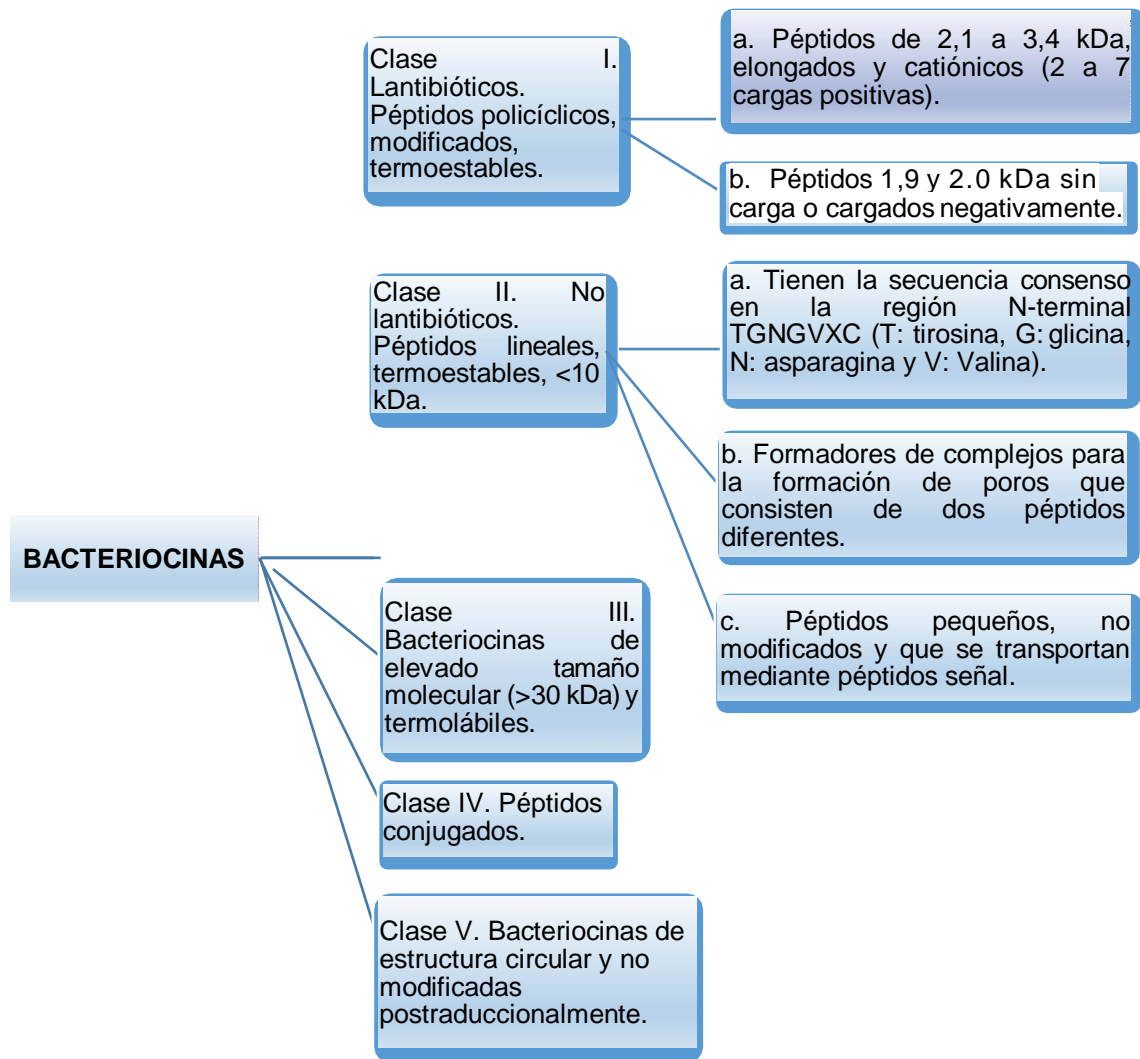
antimicrobiana, y actúan mediante un mecanismo de formación de poros en la membrana plasmática. En este grupo se encuentran la lactococcina M y G producidas por cepas de *L. lactis*.

**Clase II c:** Péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos señal. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A, lactococina.

**Clase III:** Bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles. Las bacteriocinas más conocidas de esta clase son helveticina J, acidofilicina A, lactacinas A y B y la caseicina.

**Clase IV:** Bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas.

**Clase V:** Bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasericina A (Figura 2).



**Figura 2.** Clasificación de las bacteriocinas según Heng et al. (2007)

### II.3.1.3.- Bacteriocinas más estudiadas y su efecto sobre bacterias patógenas o alterantes

Las bacteriocinas han sido obtenidas por fermentación de bacterias aisladas de diferentes alimentos especialmente de quesos y derivados lácteos (Winkelströter et al., 2015; Alegría et al., 2015; González et al., 2007; Fernández, 1996). Son producidas de forma natural y excretadas durante la fase logarítmica, generalmente influenciada por mecanismos de *quorum sensing* y por algunas señales de estrés, como una estrategia de

competencia por espacio y nutrientes (Martínez et al., 2019). La nisina es una bacteriocina producida por la bacteria *L. lactis* aislada de la leche. Es la única bacteriocina aprobada por la American Food and Drug Administration (FDA). Actualmente es utilizada en 54 países como aditivo en alimentos, especialmente en quesos procesados a una concentración de 12 mg/kg (da Silva et al., 2014). La nisina tiene una masa molecular de 3353,53 Da, es clasificada en la clase I, es termoestable y acidotolerante (Egan et al., 2016). Se han descubierto cinco variantes de la nisina: A, Z, F, Q y U. La nisina A y Z que están constituidas por 27 aminoácidos. La nisina A tiene una masa de 3516,78 Da y se diferencia con la Z porque tiene en la posición 27 una histina, mientras que la nisina Z, tiene en la posición 27 una asparagina. La nisina Z tiene una masa de 3493,74 Da. La nisina F, presentó una masa de 3479,71 Da y fue aislada de Bagre de agua dulce (*Clarias gariepinus*) (De Kwaadsteniet, 2008), mientras que la nisina Q producida por *Streptococcus uberis* fue aislada de derivados lácteos, tiene una masa de 3489,73 Da y contiene 31 aminoácidos. La nisina U presentó una masa de 3192,37 Da y difiere de las otras nisinas en 12 de sus aminoácidos, lo que equivale a un porcentaje de similitud del 82% (Wirawan et al., 2006).

La síntesis de la nisina A es compleja, requiere procesos de transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, secreción y procesamiento de señales celulares muy variadas. Es un péptido policíclico compuesto por residuos aminoácidos deshidratados (dehidroalanina y dehidrobutirina) y cinco anillos de lantionina y/o  $\beta$ -metil-lantionina formados por puentes disulfuro, en su cadena aminoacídica. Tiene carácter catiónico y es una molécula anfipática ya que el extremo N-terminal es hidrofóbico y el extremo C-terminal contiene la mayoría de los aminoácidos cargados e hidrofílicos. Además, los cinco anillos de su estructura tienen una cara hidrofóbica y otra hidrofílica (Field et al., 2015; Cheigh & Pyun, 2005).

Se ha determinado que la nisina posee un amplio espectro de inhibición ante microorganismos Gram positivos. Es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *S. aureus* y *Listeria* sp., en quesos Camembert, Ricotta y Machengo (Cintas et al., 2001).

También se ha detectado que tiene actividad frente a diferentes microorganismos esporulados como *Bacillus* sp., y *Clostridium* sp. La nisina A producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, presentó actividad frente a *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* y *C. tyrobutyricum*. La nisina Z producida por *Lactococcus lactis* NIZO 22186, presentó actividad frente a diferentes especies de *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* y *C. tyrobutyricum*. La nisina Q producida por *L. lactis* 61-14, presentó actividad frente a *Bacillus circulans*, *B. subtilis*, *B. coagulans* (Egan et al., 2016).

*Lactococcus lactis* también produce otro tipo de bacteriocinas denominadas lacticinas. Las lacticinas son péptidos que incluyen residuos inusuales de dehidrobutirina, lantionina y 3-metillantionina. Las lacticinas igual que la nisina, son estables al calor (121°C durante 15 minutos), son acidotolerantes (pH 2). A diferencia de la nisina, es estable en condiciones alcalinas pH (12), pero con un espectro de actividad antimicrobiana menor. Pueden inhibir microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, bacterias del ácido láctico y especies de estafilococos. La lacticina Q, producida por *L. lactis* QU 5 aislada del maíz, tiene una masa de 5917,05 Da y comprende 53 aminoácidos (Fujita et al., 2007), mientras que la lacticina Z tiene una masa molecular de 5959,09 Da (Iwatani et al., 2007). Estas dos bacteriocinas difieren en tres residuos de aminoácidos en las respectivas posiciones 10, 33 y 44 dentro de sus estructuras primarias (lacticin Z, dos Ile, Glu; lacticin Q, dos Leu, Ser) También se ha reportado que *L. lactis* produce una bacteriocina conformada por dos péptidos (2847 y 3306 m/z) denominada lacticina 3147 (Morgan et al., 2005).

Se ha descrito que *L. lactis* también produce unas bacteriocinas denominadas lactococinas. Las lactococinas son bacteriocinas no lantibióticas que incluyen bacteriocinas similares a pediocina (clase IIa) como lactococina MMFII cuyo peso molecular es de 4163,25 Da. También pertenecen a este grupo las bacteriocinas de dos componentes peptídicos (clase IIb) como lactococina-G  $\alpha$ , cuyo peso molecular es de

4364,59 Da y lactococcina-G  $\beta$  cuyo peso molecular es de 4128,38 Da, las bacteriocinas activadas por tiol (clase IIc) como lactococcina-B de 5346,8 Da y las bacteriocinas específicas de *Lactococcus* (clase IID) como lactococcina A o dipococcina cuyo peso molecular fue de 5797,31 Da y lactococcina 972 (Alegría et al., 2010).

La pediocina es una bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus parvulus* y *L. plantarum* WHE92. Tiene un peso molecular de 4,6 kDa, está conformada por 44 aminoácidos, no requiere modificación postraduccional, tiene carga neta positiva, con altas regiones hidrofóbicas, presenta dos puentes disulfuro. Es estable al calor y pH 4, pero es inactiva a pH 7 y temperaturas de 80°C durante 60 minutos (Ennahar & Deschamps, 2000).

La pediocina ha sido utilizada para la preservación de alimentos por tener una alta acción inhibitoria contra *L. monocytogenes* en carne, quesos y leche en polvo (Nieto-Lozano et al., 2010). La pediocina AcH presenta actividad antagónica contra *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* O157:H7 en leche y quesos Cheddar y Munster.

Hasta ahora, sólo la nisina y la pediocina PA-1 se han comercializado como aditivos alimentarios. Sin embargo, otras bacteriocinas producidas por BAL también ofrecen perspectivas prometedoras como bioconservantes en los alimentos, como por ejemplo la enterocina AS-48 (Sánchez-Hidalgo et al., 2011).

La enterocina AS-48 es una bacteriocina producida por la bacteria *Enterococcus faecalis* AS-48, presenta una estructura circular catiónica conformada por 70 aminoácidos formando 5 alfa hélices con una estructura globular compacta de 7,14 kDa y con un punto isoeléctrico de 10,09. Es estable en un amplio rango de temperatura y de pH y frente a algunos agentes desnaturalizantes, es sensible a proteasas digestivas, lo cual la hace muy conveniente para su aplicación a algunos alimentos. Los determinantes genéticos de la enterotoxina AS-48 están codificados en un plásmido (Grande et al., 2014).

Tiene una amplia actividad bactericida contra bacterias Gram-positivas,

incluyendo varias bacterias patógenas tales como *Staphylococcus aureus* y bacterias que deterioran los alimentos como *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *B. cereus*, *Paenibacillus* spp., *Geobacillus stearothermophilus*, *Brochothrix thermosphacta*, y *Staphylococcus carnosus*. Se ha determinado que las micobacterias (*Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Nocardia*) son muy sensibles a la enterocina AS-48. También *L. monocytogenes* puede ser inhibida con una concentración de 0,1 µg/mL de la bacteriocina. Bacterias esporoformadoras anaerobias facultativas y anaerobias estrictas fueron sensibles a la bacteriocina. Cuando se aplicó en altas concentraciones tuvo efecto inhibitorio frente a algunas bacterias Gram negativas como *E. coli* y *S. enterica* (Grande et al., 2014).

Un estudio evaluó el efecto de agregar la cepa *E. faecalis* A-48-32 sobre el proceso de maduración del queso Machengo. Se concluyó que la cepa produjo la bacteriocina, la cual fue estable durante un periodo de maduración de 90 días. Su adición disminuyó las poblaciones de *Bacillus* sp. en el queso, especialmente sobre las células vegetativas. La adición de la cepa no tuvo efecto sobre el cultivo starter, ni sobre la producción de ácido láctico (Muñoz et al., 2004).

En otro estudio, se determinó el efecto de la enterocina AS-48 contra *S. aureus* en queso fresco. Los resultados mostraron una fuerte inhibición de las poblaciones de *S. aureus* por debajo de 1 log UFC/g durante el almacenamiento durante 28 días a 4°C (Ananou et al., 2008).

Se ha determinado que la bacteriocina AS-48 puede producirse a gran escala utilizando lactosuero enriquecido con proteínas de la leche (como el preparado Esprión 300); los factores críticos para la producción de la enterocina AS-48 fueron la estabilización del pH a 6,5 y concentración de 1% de glucosa (Ananou et al., 2008).

También se han descrito bacteriocinas producidas por *L. plantarum* en derivados lácteos (da Silva et al., 2014). Una de ellas es la plantaricina MG, la cual fue producida por una cepa de *L. plantarum* aislado de “Jiaoke”, un producto lácteo fermentado de origen chino. La plantaricina fue purificada por precipitación con sulfato de amonio, seguido por

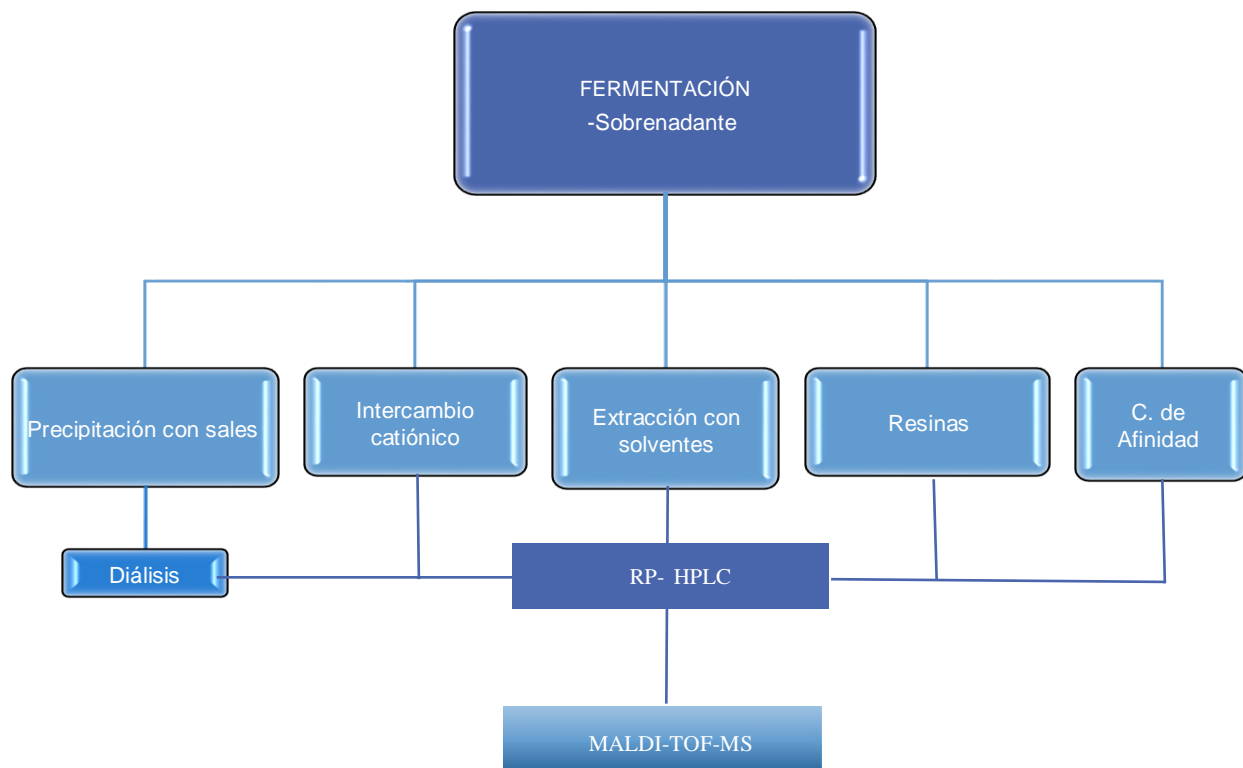
filtración en gel y cromatografía de fase reversa. La espectrofotometría de masa demostró que la plataricina MG tiene una masa molecular de aproximadamente 2180 Da. La bacteriocina fue estable al calor, retuvo su actividad entre pH 2 y 10, fue sensible a enzimas proteolíticas y su modo de acción fue bactericida. Da Silva et al. (2014), determinaron que la plataricina MG pudo inhibir a bacterias como *Listeria* sp., *S. aureus*, *Salmonella* sp. y *E. coli*, y formas esporuladas de *B. cereus*, *B. subtilis* y *C. perfringens*.

#### II.3.1.4.- Técnicas utilizadas para seleccionar, caracterizar y purificar bacteriocinas

Las bacteriocinas se liberan al medio en la fase exponencial del crecimiento microbiano (Martínez-Viedma et al., 2009). Lo primero que se hace es el aislamiento y la selección de cepas bacteriocinogénicas. La producción de bacteriocinas se evalúa mediante los métodos de la gota, difusión en disco, o mediante la prueba de difusión en pozos de agar (Balouiri et al., 2016; Chandrasekar et., 2015). La prueba de difusión en pozos de agar es la más adecuada para cepas que producen sustancias antimicrobianas con actividades relativamente bajas (Zou et al., 2018). Este método se realiza generalmente en un medio de cultivo denominado BHA tamponado. Consiste en poner una primera capa de agar sólida (1,0-1,5%) en cajas de Petri estériles. Luego se coloca las torrecillas Oxford estériles y una segunda capa de agar semisólido con la bacteria indicadora (generalmente es la cepa patógena) a 50°C denominada sobre-capa y se deja solidificar. Después se quitan las torrecillas y se forman pozos en los cuales se cargan las muestras, que en este caso son los sobrenadantes de las BAL los cuales se sospecha que contienen las sustancias antibacterianas. Las placas se incuban para permitir el crecimiento del microorganismo indicador y la difusión de la muestra. Si se presenta actividad antibacteriana, se observará un halo de inhibición alrededor del pocillo (Olvera-García et al., 2015; Balouiri et al., 2016).

Las cepas bacteriocinogénicas tienen que caracterizarse, de tal manera que se identifique si se trata de una cepa patógena. Si es así, en el caso de que tenga una gran actividad no se podría utilizar para la aplicación de alimento. Siempre se le da prioridad a las cepas que no son patógenas. Esta caracterización se da mediante técnicas fenotípicas

como genéticas. Además, se tienen que conocer las características del microorganismo, saber a qué especie pertenece, cuál es su temperatura óptima, cual su pH óptimo de crecimiento, si es aerobio, anaerobio facultativo, aerobio estricto o microaerófilo. También es importante saber el perfil bioquímico de las cepas seleccionadas, el medio de cultivo óptimo para su crecimiento, el cual para su producción masiva debería ser de bajo costo (Ananou et al., 2008). Se ha determinado que existen medios comerciales para el crecimiento de las BAL. Entre los más comunes son el caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y el medio Elliker. No obstante, para la producción en masa de las bacteriocinas se recomienda utilizar sustratos económicos. El lactosuero, subproducto de la elaboración del queso, podría ser utilizado para la producción de bacteriocinas (Ananou et al., 2008). Luego se debe de realizar una curva de crecimiento en el medio de cultivo seleccionado con el fin determinar el tiempo donde ocurre la mayor producción de bacteriocina. Luego de conocer cuál es el tiempo en el cual se produce la mayor concentración de bacteriocina se debe de eliminar la biomasa microbiana, recuperar la bacteriocina y concentrarla. Las bacteriocinas pueden llegar a purificarse y concentrarse del medio de cultivo por diferentes métodos. Los métodos de purificación se seleccionan en función de las características del péptido antimicrobiano con el que se trabaje. Para ello se tienen que evaluar la resistencia al calor, la tolerancia a diferentes valores de pH y a diferentes concentraciones de sustancias orgánicas. Además, se tiene que realizar una revisión bibliográfica exhaustiva especialmente de estas características, como también de la masa molecular y las propiedades de carga de las “posibles” bacteriocinas (Zou et al., 2018). Actualmente los mecanismos que se perfilan como idóneos para estos fines son las técnicas de precipitación, ultrafiltración, secado por electrospray, diálisis y cromatografía de intercambio catiónico entre otras (Zou et al., 2018; Olvera-García et al., 2015) (Figura 3).



**Figura 3.** Representación de las diferentes técnicas que se utilizan para la purificación de las bacteriocinas

La precipitación de proteínas ocurre por la neutralización de cargas de la superficie de la proteína por la sal, por la reducción de la actividad acuosa de la proteína y por la disminución efectiva de la concentración de agua en el medio, este fenómeno se conoce como “salting out”. Una de las sales que más se han utilizado para la precipitación de proteínas es el sulfato de amonio (Zou et al., 2018). Un limitante de la precipitación de proteínas con sales es que se tiene que realizar una purificación adicional porque queda la residualidad de los productos químicos. Cuando se hace una precipitación con sales, generalmente se realiza un proceso de diálisis (Gong et al., 2010). También se puede lograr la precipitación por solventes (ácido tricloro acético, cloroformo, etanol; Olvera- García et al., 2015). La extracción con solventes orgánicos es más simple que la utilización de sales, sin embargo, estos métodos son más costosos, y su utilización puede contaminar

el ambiente, algunos solventes son tóxicos y pueden afectar la actividad de la bacteriocina. También se pueden utilizar polímeros orgánicos, como resinas macroporosas, sin embargo, requiere otros pasos en la extracción (Zhu et al., 2014).

Las bacteriocinas producidas por BAL en su mayoría tienen cargas negativas, lo cual permite su purificación mediante absorción sobre matrices de intercambio catiónico y posterior elución a partir de las mismas. Ejemplos de este procedimiento son la purificación de la enterocina AS-48, mediante cromatografía de intercambio catiónico en geles de Sephadex CM25 (Abriouel et al., 2003), y purificación de la enterocina P, mediante cromatografía de intercambio catiónico en geles de Sepharose (Parveen et al., 2016).

Se ha descrito que las bacteriocinas pueden ser purificadas simplemente mediante un procedimiento de dos pasos (Abriouel et al., 2003). El primer paso es la recuperación de la bacteriocina mediante cromatografía de intercambio iónico sobre un gel como CM Sephadex® C-25 (Sigma C25120). El gel es preparado reconstituyendo el producto comercial y luego se agrega directamente al cultivo bacteriano productor de la bacteriocina, el cual debe tener un pH entre 6 y 10, preferible 6,5. Posteriormente la mezcla se agita y se decanta por otros 30 minutos. El sobrenadante (medio de cultivo) se remueve y luego el gel se carga en una columna de vidrio. Posteriormente el gel se eluye aplicando volúmenes de agua destilada seguido de una solución de NaCl (0,5-1,5 M) en agua destilada. Las eluciones se recogen, se filtran por membrana (0,22 µm, Millipore). Posteriormente se determina la actividad antimicrobiana de los eluidos y se seleccionan las fracciones que tienen mayor actividad antimicrobiana.

El paso final de la purificación de la bacteriocinas es la cromatografía de fase reversa de alta resolución (RP-HPLC). Para ello se acopla al equipo columnas de exclusión de tamaño, específicas para separar polipéptidos (Zhu et al., 2014; Chang et al., 2013). Se inyectan los eluidos obtenidos por intercambio catiónico con mayor actividad antimicrobiana. Las moléculas de bacteriocina quedan retenidas por la columna. El material retenido en la columna luego es eluido con un gradiente de solventes orgánicos

preferiblemente alcohol isopropílico/acetonitrilo/ácido ácido trifluoroacético (Abriouel et al., 2003). La bacteriocina es colectada en diferentes fracciones acorde a sus picos de absorbancia detectados en el espectro ultravioleta (200-210 nm), posteriormente pueden ser guardadas a -20°C o liofilizadas y redisueltas en agua destilada (Ananou et al., 2008). La pureza y masa molecular de la bacteriocina puede ser evaluada por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 15% (Chang et al., 2013; Abriouel, 2003) sin embargo es un proceso complejo que lleva mucho tiempo y las estimaciones de masa molecular no pueden determinarse con precisión mediante la observación de bandas electroforéticas (Zou et al., 2018).

La masa molecular de las bacteriocinas puede ser determinada mediante espectrofotometría de masas MALDI-TOF-MS (Gong et al., 2010). La espectrometría de masas MALDI-TOF se denomina MALDI por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización por láser asistida por matriz) y TOF por el analizador Time of Flight (tiempo de vuelo) que se integra típicamente con fuentes de ionización MALDI (Figura 3).

La técnica consiste en la formación de iones utilizando pulsos de luz láser sobre una muestra cristalizada, lo cuales son expulsados de la muestra al vacío para luego ser análisis por desorción. Esta técnica se ha utilizado ampliamente en el análisis de péptidos. Es una técnica fácil, reproducible, exacta y muy sensible, permite detectar concentraciones del orden de picomoles (Rose et al., 1999). Sin embargo, las muestras que contiene una gran concentración de sales, detergentes y glicerol, pueden suprimir la señal completamente o resultar en un cambio en los patrones espectrales, afectando la reproducibilidad del método (Wang et al., 1998). Uno de los medios de cultivo más comunes empleados en el laboratorio de microbiología para la producción de bacteriocinas a partir de BAL, es el caldo MRS. Este caldo está compuesto por un detergente llamado Tween, por lo cual este medio puede intervenir en el análisis. Por lo cual se recomienda la purificación parcial de la bacteriocina para obtener una muestra más limpia y más concentrada para su análisis por MALDI-TOF-MS. Se ha comprobado que una purificación parcial mediante cromatografía de intercambio catiónico y también por

RP-HPLC, permite una mejor resolución y sensibilidad al analizar las muestras de bacteriocinas mediante MALDI-TOF-MS (Zou et al., 2018; Rose et al., 1999). Sin embargo, este procedimiento puede consumir más tiempo, puede dar lugar a pérdida de la bacteriocina e inclusive pueden introducir más contaminantes a las muestras (Rose et al., 1999). Experimentos realizados por García-Cayuela et al. (2017), pudieron detectar bacteriocinas (nisina y lacticina 481) en BAL aisladas de quesos elaborados con leche cruda, directamente a partir de su crecimiento en caldo M17. Además, la técnica detectó otras proteínas de una masa molecular baja (2-4 kDa), que no coincide con las ya reportadas en las bases de datos y que podrían considerarse como péptidos antimicrobianos potenciales.

### **III.- Métodos utilizados para determinar la composición bacteriana del queso**

#### **III.1.- Métodos dependientes de cultivo**

Las técnicas dependientes de cultivo son aquellas que consisten en aislar y cultivar cepas antes de su identificación de acuerdo con las características fenotípicas o genotípicas. Las ventajas de estas técnicas es que permite detectar microorganismos viables, es decir metabólicamente activos. El análisis de las comunidades microbianas por métodos dependientes del cultivo es laborioso y requiere el uso de métodos y condiciones selectivas que son específicos para cada grupo microbiano. Además, requieren mucho tiempo por los largos periodos de incubación. Algunos procedimientos pueden durar una semana. También tienen como desventaja que solo se permite analizar una fracción de la comunidad, porque solo una pequeña fracción de microorganismos puede ser recuperado en medios de cultivo mediante modos semi-aleatorios de selección de colonias y, a menudo, los aislamientos no parecen representar el inventario taxonómico real de microorganismos pues algunos microorganismos son malos competidores y por lo tanto, no son fácilmente recuperables (Ndoye et al., 2011).

Entre los métodos dependientes de cultivo más utilizado en la industria de alimentos están recuento en placa, el recuento en placa con confirmación posterior, Número más probable y/o tubos múltiples de fermentación (NMP/mL) y técnicas de enriquecimiento selectivo.

##### **III.1.1.- Recuento en placa**

Es un método directo de la medida de la densidad celular o masa poblacional, tiene como ventaja que revela únicamente los microorganismos viables. Consiste en realizar diluciones seriadas en base 10 de la muestra en una solución isotónica estéril hasta que los microorganismos queden lo suficientemente diluidos como para poder ser contados en un medio de cultivo. Posteriormente se siembran alícuotas de las diluciones seriadas en placa profunda o mediante extensión o superficie. El método de siembra en placa profunda consiste en agregar 1 mL de cada una de las diluciones seriadas sobre cajas de Petri

vacías estériles, a las cuales se le agrega el agar fundido a una temperatura aproximada de 50°C y se mezclan bien, con movimientos suaves sobre la superficie de la mesa, antes de que se solidifique el medio de cultivo. Posteriormente se incuban las cajas solidificadas y luego se realiza el recuento en placa de las unidades formadoras de colonias (UFC/g o mL) de una muestra. El método por extensión o superficie consiste en agregar 0,1 mL de la dilución en cajas de Petri con el medio previamente solidificado. Posteriormente se realiza una dispersión uniforme de la alícuota con asas de Hockey o rastrillo de vidrio o acero, luego las cajas se incuban a la temperatura óptima y se realiza el recuento de UFC/g o mL. Existe una variante del método de recuento en placa el cual se aplica cuando el microorganismo requiere una identificación posterior. Se debe realizar únicamente el recuento de las colonias presuntivas (colonias típicas de ese microorganismo creciendo en ese medio de cultivo selectivo y/o diferencial). Luego se toma un número determinado de colonias presuntivas (por lo general se toman 5 colonias) y se confirman con pruebas de identificación. Luego se corrige el recuento mediante la aplicación de una fórmula (ICONTEC, 2009).

### III.1.2.- Número más probable

El número más probable (NMP/g o mL) es un método matemático indirecto que permite estimar la población de un grupo microbiano basándose en la observación de la presencia ausencia de una o varias características de microorganismos (positiva o negativa) utilizando tablas de probabilidades estadísticas de Poisson.

Este método es menos preciso que el recuento en placa cuando se trata de muestras que contienen altas poblaciones microbianas, pero es más eficaz en muestras que contienen poblaciones bajas de microorganismos. Este método tiene sus variantes. El método clásico consiste en realizar diluciones seriadas de la muestra en una solución isotónica y cultivar 1 mL de 3 diluciones seriadas por triplicado en caldo selectivos y diferenciales. Pasado el tiempo de incubación se realiza una prueba confirmativa sembrando una asada en nuevos tubos de fermentación y luego realizando una prueba complementaria, la cual consiste en aislar e identificar las bacterias en agares selectivos y

diferenciales. Luego se determinan los tubos positivos por dilución y se estima el número más probable de microorganismos en la muestra original mediante la interpretación de la tabla de probabilidades estadísticas de Poisson y la aplicación de la fórmula. La precisión del método aumenta al aumentar el número de replicación por dilución (ICONTEC, 2009).

La técnica del NMP/g o mL tiene como desventaja que puede durar varios días, consume tiempo y muchos materiales. Hoy en día, la técnica ha sido mejorada con el diseño de medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos. También es conocida como técnica enzima-sustrato definido. El procedimiento es el mismo que para los tubos múltiples de fermentación, con la diferencia que no se requiere una prueba confirmativa, ni una identificación posterior. El método detecta simultáneamente coliformes totales y *E. coli* después de 18 h de incubación a 37°C. El medio de cultivo tiene lauril sulfato de sodio que inhibe a los Gram positivos. También presenta un compuesto cromogénico conocido como X-GAL (5-bromo.4-cloro-3 indolil β-D-galactopiranosido) el cual es escindido por la enzima β-D-galactosidasa produciendo un color verde azulado al medio de cultivo, lo cual indica presencia de coliformes. El medio a su vez tiene un sustrato fluorogénico denominado 4-metilumbifenil β-D-glucónido, el cual es escindido por la β-D-gucuronidasa produciendo fluorescencia cuando los tubos son iluminados con los UV a 360 nm. Esto indica la presencia de *E. coli*. El medio también tiene triptófano, por lo cual se puede evidenciar la producción de indol característico de *E. coli* al agregar el reactivo de Kovac's (Merck, 2020a; Beltrán & Castellanos-Rozo, 2016; Madigan et al., 2010).

### III.1.3.- Método de enriquecimiento

Se utiliza para los microbios que se encuentran en concentraciones muy pequeñas en la muestra, que son malos competidores y/o cuyo crecimiento es lento o son exigentes nutricionalmente. Su objetivo es suministrar las condiciones favorables para que la concentración de microorganismos aumente, de tal manera que luego pueda ser recuperados e identificados. Los resultados generalmente se reportan como presencia o ausencia. El enriquecimiento puede ser no selectivo como caldo tripticasa de soja, agua peptonada, entre otros. Este tipo de enriquecimiento permite el crecimiento de los

microorganismos presentes en la muestra. Eso depende del tipo de microorganismo y su metabolismo. Algunos métodos emplean directamente un enriquecimiento selectivo, es decir promueve el crecimiento del microorganismo en cuestión, inhibiendo la flora acompañante. El crecimiento del microorganismo a analizar puede favorecerse al aumentar o disminuir la temperatura de incubación, por el pH del medio de cultivo (básico o ácido), aumentando las concentraciones de sal o las condiciones de gases (aerobio, anaerobio o microaerófilo) y/o agregando ciertos compuestos químicos que inhiben el crecimiento de la microbiota acompañante, por ejemplo, el uso de los antibióticos o de sales por ejemplo el lauril sulfato de sodio que inhibe a los Gram positivos (Madigan et al., 2010).

#### III.1.4.- Métodos de identificación y caracterización bacteriana

Cuando se hacen recuentos con confirmación posterior o métodos de enriquecimiento, se requiere el aislamiento de los microorganismos y posteriormente la identificación bacteriana. Entre los métodos de identificación bacteriana se encuentran los métodos fenotípicos, métodos inmunocromatográficas y métodos moleculares en las que se destacan la secuenciación del gen ARNr 16S y MALDI-TOF. La ventaja de estos métodos es que los microorganismos van a estar disponibles para futuros estudios, permite la identificación a nivel de especie. La desventaja es que no es aplicable para microorganismos no cultivables (Vartoukian et al., 2010).

##### III.1.4.1.- Métodos fenotípicos

Son aquellos que se basan en las características observables de las bacterias, como las características macroscópicas, morfología, pruebas bioquímicas o metabólicas, requerimientos de desarrollo o crecimiento (condiciones de oxígeno, pH, concentración de sal, temperatura) y pruebas de resistencia a antibióticos y biocidas. Para la realización de estos métodos generalmente tiene que aislarse el microorganismo. En este tipo de métodos la experiencia del analista es fundamental.

#### III.1.4.1.1.- Caracterización macroscópica

La caracterización macroscópica hace referencia a la descripción de las colonias que crecen sobre un medio de cultivo determinado. Las características que se observan son la elevación que puede ser plana, convexa, umbilicada, papilar, mamelonada, el borde o margen de la colonia el cual puede ser regular, irregular, lobulado o filamentosos. También se observa el aspecto si es brillante u opaca, la consistencia, si es dura, blanca o mucoide, el color de la colonia y en algunos casos se puede distinguir la colonia de los microorganismos por el olor. También se puede evaluar si el microorganismo produce hemólisis en agar sangre (Beltrán & Castellanos-Rozo, 2016).

#### III.1.4.1.2.- Caracterización microscópica

La caracterización microscópica hace referencia a la observación de la morfología, las agrupaciones y las diferentes estructuras de los microorganismos a través del microscopio. Para ello se han desarrollado tinción simples y diferenciales. Al realizar una tinción simple podemos distinguir la morfología de los microorganismos (cocos, bacilos, cocobacilos, vibrios o espiroquetas) y si presentan algún tipo de agrupación (diplococos, estreptococos, estafilococos, diplobacilos, estreptobacilos, sarcinas o tétradas). La tinción de Gram es una tinción compuesta (utiliza varios colorantes), que nos permite diferenciar la constitución de las paredes celulares de la mayoría de las bacterias. Si se observan al microscopio de color morado después de haber realizado la tinción se clasifican en Gram positivas, si se observan de color rosado se clasifican como Gram negativas. También hay tinción que permiten diferenciar diferentes estructuras celulares como la tinción de tinta china para visualizar la cápsula, la Schaeffer Fulton para la visualización de endosporas, o la tinción de Leifson para visualizar flagelos (Madigan et al., 2010; Beltrán & Castellanos-Rozo, 2016).

#### III.1.4.1.3.- Caracterización bioquímica

La caracterización bioquímica consiste en determinar las capacidades metabólicas que tienen las bacterias para degradar o transformar ciertos tipos de sustratos. Hay pruebas

que se utilizan para realizar una identificación preliminar y con lectura inmediata como la catalasa y oxidasa. También existe pruebas que se pueden leer a las 6 h como la coagulasa, hidrólisis del hipurato, la  $\beta$ -galactosidasa (ONPG), las aminopeptidasas y la producción de indol. Existen pruebas con tiempos de lectura de 18 a 48h que incluirían la óxido-fermentación, reducción de nitratos, rojo de metilo, Voges-Proskauer, Agar hierro de Kligler, fermentación de azúcares, hidrólisis de la esculina, fenilalanina-desaminasa, DNasa, hidrólisis de la gelatina, decarboxilasas, lipasa, lecitinasa, utilización de citrato, utilización de malonato, y prueba de CAMP entre las más frecuentes. Estos métodos son tediosos y consumen muchos recursos y tiempo. Algunas bacterias presentan resultados variables en las pruebas bioquímicas, lo cual dificulta su identificación. Hoy en día estas desventajas se han venido superando debido a que ya existen numerosos sistemas miniaturizados o equipos multipruebas que ocupan menos espacio, consumen menos recursos y son más rápidos en la identificación de algunas bacterias. Todos exigen unas condiciones muy precisas de concentración del inóculo, de incubación y de lectura, que si no se observan pueden dar lugar a importantes errores. Estos sistemas pueden ser manuales y automatizados (Bou et al., 2011). Entre ellos se destacan API (bioMérieux), Enterotube (BBL), Oxi/Ferm Tube (BD), RapID systems y MicroID (Remel), Biochemical ID systems (Microgen) y BBL crystal. El sistema BD BBL crystal un método de identificación en miniatura que son modificaciones de métodos clásicos, incluyendo pruebas para la fermentación, la oxidación, la degradación y la hidrólisis de varios sustratos. La ventaja de este sistema es que además de utilizar sustratos convencionales, incorpora sustratos fluorogénicos y cromogénicos modificados. Las pruebas se leen de acuerdo al color o a la emisión de fluorescencia. Se genera un código que es incorporado en un ordenador con el software específico instalado. El código se coloca en la interface y lo compara con una base de datos de microorganismos proporcionando un índice de fiabilidad para la identificación del microorganismo. La ventaja de este método es que no requiere agregar reactivos adicionales para la identificación. Las desventajas de estos métodos es que están diseñados solo para los grupos taxonómicos suministrados y no es recomendable identificar microorganismos que provienen de medios que contienen esculina. Las pruebas pueden variar entre cepas de la misma especie, pues algunas cepas pueden generar reacciones atípicas. Una misma cepa puede generar diferentes resultados

en ensayos repetidos (BBL™ Crystal™ Identification, 2020).

#### III.1.4.1.4.- Pruebas de resistencia o tolerancia

Este tipo de pruebas se basan en la capacidad que tienen los microorganismos para resistir o tolerar ciertos factores como la temperatura (psicrófilo, mesófilo, termotolerante, termodúrico, termófilo), valores de pH (acidófilo, neutrófilos, basófilo), concentración de gases (aerobio, aerobio facultativo, microaerofílico, anaerobio estricto). También implican la capacidad que tienen los microorganismos de crecer en ambiente salinos (halotolerantes o halófilos), la capacidad de resistir antibióticos por ejemplo (optoquina, bacitracina), o tolerar los biocidas. Estas pruebas pueden ser cualitativas o cuantitativas (Madigan et al., 2010). Estas pruebas son importantes porque indican la capacidad que tiene los microorganismos para sobrevivir en el sistema alimentario, así se pueden formular estrategias para poder controlarlos o potenciarlos.

##### III.1.4.1.4.1.- Pruebas de tolerancia a temperatura, pH, concentración de NaCl

La prueba cualitativa para determinar el crecimiento a diferentes temperaturas consiste en sembrar de forma masiva el microorganismo en un medio de cultivo nutritivo no selectivo, este medio puede ser sólido o líquido. Las cajas o tubos sembradas son incubados a las diferentes temperaturas durante 24 a 72 h (dependiendo del microorganismo) (Madigan et al., 2010).

La tolerancia a diferentes valores de pH, se realiza en medio líquido no selectivo, ya que por debajo de un pH de 4 el agar (agente gelificante del medio sólido) se hidroliza. El pH del medio líquido debe de ser ajustado con NaOH o HCl antes de esterilizarse el medio. Luego los microorganismos son inoculados e incubados a su temperatura óptima de crecimiento. Si se presenta crecimiento después de la incubación significa que el microorganismo tolera ese valor de pH (Madigan et al., 2010).

La tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl se puede realizar en medios de cultivo líquidos o sólidos preferiblemente no selectivos. La concentración de NaCl de los

medios es ajustada antes de ser esterilizados. Luego de preparados los medios son inoculados con las bacterias. Posteriormente se incuban a la temperatura y tiempo óptimos para el crecimiento de los microorganismos. Si se presenta turbidez después de la incubación significa que el microorganismo tolera esa concentración de sal (Madigan et al., 2010)

#### III.1.4.1.4.2.- Pruebas de resistencia a antibióticos y tolerancia a biocidas

La resistencia a los antibióticos y biocidas se puede determinar mediante el método de difusión en disco también llamado método de Kirby-Bauer y el método de microdilución en placa (CLSI, 2019).

##### III.1.4.1.4.2.1.- Método de difusión en disco

El método en difusión en disco consiste en sembrar de forma masiva (con un hisopo), un inóculo estandarizado de bacterias (generalmente con una turbidez de 0,5 de la escala de MacFarland) en cajas de Petri con agar Müller-Hinton. Luego se colocan los sensidiscos con una suave presión (papel filtro impregnado con una concentración conocida de un antibiótico determinado) con pinzas estériles. Luego las placas se dejan secar durante 20 minutos y se incuban con la tapa hacia arriba a temperatura de 37°C durante 18 a 24 h. Luego se miden los halos de inhibición, se comparan con tablas y se expresan los resultados como sensible (S), intermedio (I), y resistente (R). El método no es costoso y es fácil de hacer. Sin embargo, para su utilización requiere ser estandarizado porque existe múltiples variables que pueden afectar los resultados. Se recomienda la utilización del agar Müller-Hinton pues es un medio de cultivo nutritivo, no selectivo donde crecen bien la mayor parte de las bacterias patógenas, hay muy pocas diferencias entre los distintos lotes comercializados, lo que ayuda a una estandarización entre laboratorios, y además no contiene timina o timidina, que son inhibidores de sulfamidas y del trimetoprim (CLSI, 2019). La cantidad de medio por placa puede afectar los resultados. Las placas no deben estar húmedas, eso afecta el crecimiento del microorganismo y la difusión del antibiótico y por ende los resultados. Se recomienda 15 mL de medio de cultivo por placa ya que la cantidad de medio puede afectar la difusión

del antibiótico. Se debe estandarizar la cantidad de bacterias (inóculo) ya que cuando se agrega una mayor concentración o menor concentración de bacterias podría afectar los resultados. Los antibióticos en la placa deben de estar separados pues podría haber actividad sinérgica entre dos antibióticos (de 4 a 5 sensidiscos por placa) y se deben de respetar las temperatura y tiempos de incubación porque la temperatura puede disminuir el crecimiento de la bacteria y la difusión del antibiótico, afecta el resultado. Este método es un método cualitativo y no sirve para microorganismos exigentes o anaerobios. Para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias se debe de aplicar el método de dilución (CLSI, 2019).

#### III.1.4.1.4.1.2.- Método de dilución

Consiste en determinar el crecimiento de un microorganismo en diferentes diluciones de un antimicrobiano. Se puede realizar en agar y en caldo. Inicialmente el método se desarrolló empleando baterías de tubos con caldo nutritivo con diferentes concentraciones del antimicrobiano (Macrodilución) o haciendo placas de agar con diferentes concentraciones del antimicrobiano (dilución en agar).

Hoy en día, el uso de micropipetas, la utilizando de placas de microtitulación y la utilización de sistemas automatizados como lectores Elisa, han facilitado el trabajo empleando menos material y en menos tiempo.

Lo primero que se hace es cultivar las bacterias generalmente a 37°C *overnight* en un caldo no selectivo adecuado. Generalmente se utiliza caldo tripticasa de soja (TSB). Luego, se realizan diluciones en base 10 de cada cepa bacteriana hasta alcanzar una turbidez aproximada al tubo 0,5 de la escala de MacFarland. El inóculo ya diluido debe usarse antes de 15 minutos tras su preparación.

Luego se disuelven los antimicrobianos en un solvente adecuado. Si no se disuelven en agua, lo mejor es disolverlos en etanol. Generalmente se prepara el antimicrobiano al 10%. Luego se hacen diluciones en base dos del antimicrobiano en caldo TSB.

Teniendo en cuenta que la mayoría de placas disponibles tienen 96 pocillos (12x8), podemos evaluar para un mismo microorganismo 8 antimicrobianos y 10 diluciones (las últimas columnas se suelen utilizar como control de crecimiento). Sin embargo, eso depende del diseño del experimento. También se puede evaluar un solo antimicrobiano, 8 cepas y 8 diluciones. El volumen final de cada pocillo es habitualmente 200  $\mu$ L, eso depende de la placa. Dependiendo, pues, del volumen de inóculo final, las placas se rellenan utilizando una micropipeta multicanal, puede ser 180  $\mu$ L de la solución más alta del antimicrobiano en la fila 1. Luego se llena la micropipeta multicanal con 180  $\mu$ L de la siguiente concentración del antimicrobiano y se deposita en la fila 2. El procedimiento se repite hasta la fila 8. Posteriormente se añade un volumen de 20  $\mu$ L de la cepa diluida en caldo TSB sin antimicrobiano en los pocillos de las columnas 1 a 8. En la columna 9 se colocan 200  $\mu$ L de las distintas concentraciones del antimicrobiano a ensayar los cuales constituyen los controles negativos de cada biocida. En la columna 10 se colocan 180  $\mu$ L de TSB líquido estéril al que se le ha inoculado 20  $\mu$ L de la dilución 1/10 de la bacteria (control positivo). Finalmente se ensayan dos controles negativos de 200  $\mu$ L de TSB estéril en los extremos de la placa.

Las placas de microdilución deben taparse o sellarse para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Las placas generalmente se incubarán a 35°C durante 16 a 20 horas. No se deben apilar más de cuatro o cinco placas. Tras la incubación se procede a la lectura de los resultados. La interpretación de los resultados, se hace tomando como referencia el crecimiento observado en los tubos o pocillos usados como control positivo. En el caso de las placas de microdilución dichos controles positivos deben presentar una clara turbidez. Para observar el crecimiento de los pocillos, a veces resulta necesario limpiar la parte inferior de la placa de microtitulación, lo que puede realizarse con papel absorbente. La lectura es más sencilla utilizando un lector ELISA en el que se refleja la parte inferior de la placa de microtitulación respectivamente. Algunos autores han establecido que una densidad óptica de  $\leq 0,5$  a 600 nm es sensible al antimicrobiano usado.

Este método igual que el método de difusión en disco, también requiere una estandarización pues factores como el medio de cultivo, la concentración del inóculo podrían influir en los resultados. También es necesario considerar los solventes necesarios para la preparación de los antimicrobianos más habituales pues no todos se disuelven en agua.

#### III.1.4.2.- Métodos inmunocromatográficos

Las técnicas inmunocromatográficas son técnicas modernas cuyas principales ventajas son la simplicidad y rapidez de la prueba. No es necesario reactivos ni instrumentación adicional. Inclusive pueden determinar microorganismos directamente de los alimentos. La prueba consiste en la migración de una muestra a través de una membrana de nitrocelulosa. La muestra es añadida en un orificio y es succionada a través del acolchado de papel hasta la zona de reacción donde se encuentra el conjugado, el cual está formado por un anticuerpo específico marcados contra el antígeno a detectar y un reactivo de detección. Si la muestra contiene el antígeno problema, éste se unirá al conjugado formando un complejo inmune y migrará a través de la membrana de nitrocelulosa. Si no, migrarán el conjugado y la muestra por separado. La zona de captura contiene un segundo anticuerpo específico contra el antígeno. Al llegar la muestra a esta zona, los complejos formados por la unión del antígeno y conjugado quedarán retenidos y la línea se coloreará en este caso como rosa o azul (muestras positivas). En el caso contrario se considera que las muestras son negativas. En los laboratorios de microbiología de alimentos se utilizan para detectar la presencia de *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes* de una manera fácil y rápida. La desventaja de este método es que es un método cualitativo. Solo se puede reportar presencia o ausencia del microorganismo y requiere una concentración de aproximadamente  $5 \times 10^6$  bacterias/mL (Merck, 2020b).

#### III.1.4.3.- Métodos genéticos

La secuenciación de ADNr 16S es la técnica más utilizada para identificar especies bacterianas aisladas de queso (Mohania et al., 2008). El gen para el ARNr de la subunidad pequeña procariota, comúnmente llamado gen ARNr 16S, es el marcador molecular más

utilizado en ecología microbiana debido a sus características como la abundancia universal, propiedades evolutivas y filogenéticas, alto potencial discriminatorio que permite análisis sensibles y disponibilidad de secuencias en bases de datos. Contiene regiones tanto variables como conservadas (Klindworth et al., 2013). Las regiones variables, permiten la discriminación de los niveles taxonómicos, y las secuencias conservadas representan los sitios de reconocimiento para cebadores universales en la PCR (Ndoye et al., 2011). La secuencia del gen ARNr 16S tiene 1.500 pb. Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas (Bou et al., 2011). Este tipo de método puede ser aplicado para la identificación de todo tipo de aislamientos, específicamente se utiliza para cepas con escasa descripción, con baja frecuencia de aislamiento, con fenotipos atípicos, difícil identificación fenotípica, cepas de crecimiento lento o fastidioso (Bou et al., 2011; Ndoye et al., 2011).

Para la aplicación de este tipo de método se debe hacer la extracción de ADN a partir de cultivos puros jóvenes. Este ADN se puede extraer por diferentes kits que hay en el mercado. Luego se debe de evaluar integridad del ADN mediante un gel de electroforesis. Si el ADN está integro, se debe observar una banda definida cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN. Si está fragmentado, se observará una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra. El rendimiento y calidad del ADN se determina mediante la medición de la concentración y la pureza. Ello se logra mediante espectrofotometría. Generalmente un ADN de buena calidad presenta concentraciones de concentración de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y tiene una relación 260/280 de 1,8 a 2,0. Proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la relación 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2,0 a 2,2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol (Cornejo et al., 2014). Posteriormente se realiza una PCR con cebadores universales que amplifica un fragmento del gen ARNr 16S. Luego de realizar la PCR, se tiene que realizar un gel de electroforesis para verificar la amplificación del gen y luego se limpian los productos amplificados y se mandan a secuenciar. Para la identificación de género o especie, la secuencia parcial o completa de

estos genes se editan en programas especializados (por ejemplo, Bioedit) y luego se comparan con secuencias de microorganismos conocidos con programas como BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y o herramientas en línea y se determina el porcentaje de similitud. El criterio para la identificación de especie es Mínimo: > 98,5% similitud, ideal: > 99% similitud.

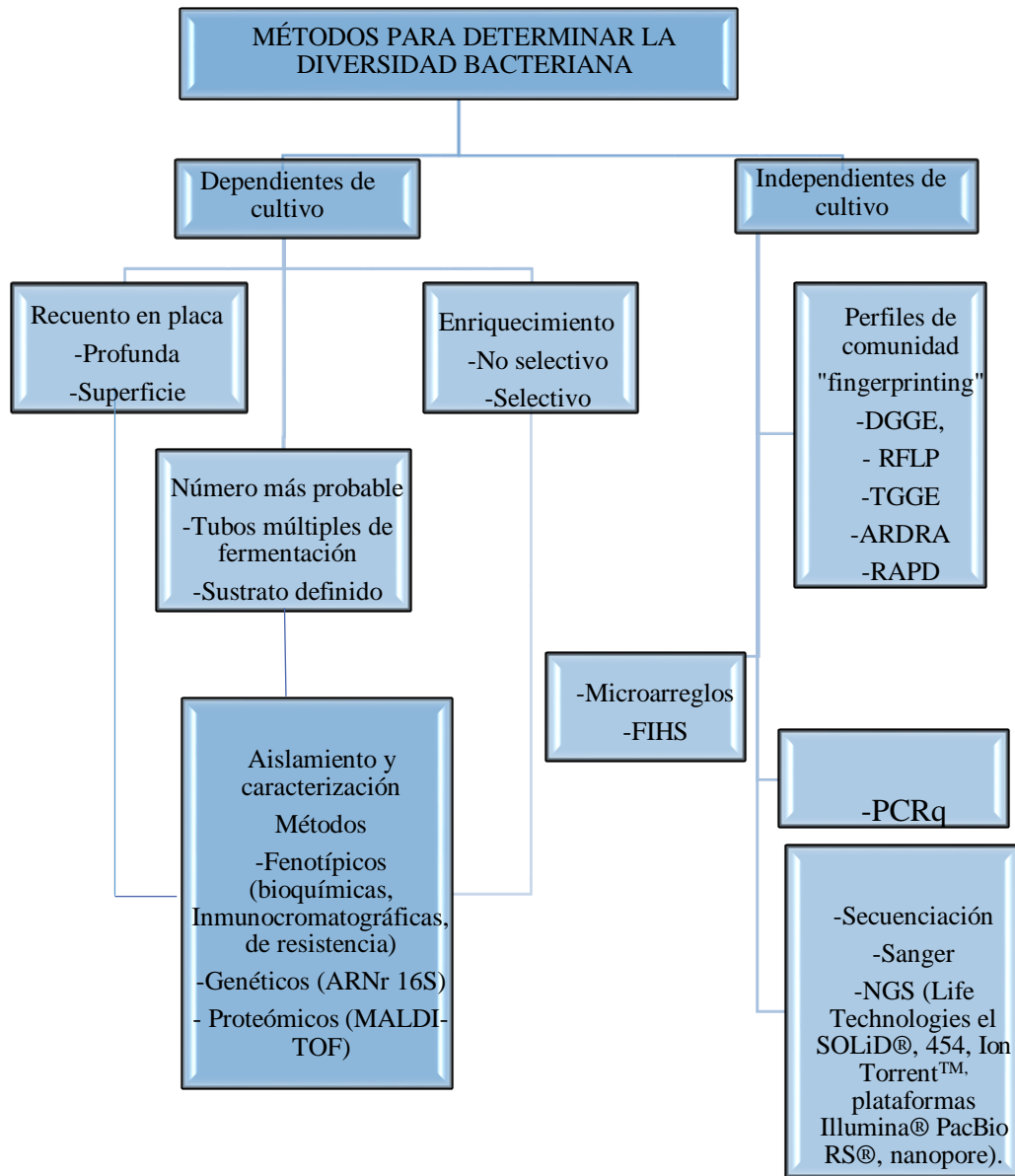
La desventaja de este método es que no alcanza a discriminar entre cepas que tienen un alto grado de homología genéticamente, es decir no pueden discriminar entre subespecies o serovariedades, y a veces tampoco entre diferentes especies de un mismo género. En estos casos, podemos recurrir a otros genes dianas como el espacio intergénico del ADNr 16S-23S (ITS), el gen *rpoB* (subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa) y el gen *gyrB* (subunidad  $\beta$  del ADN girasa), los cuales presenta un alto grado de variabilidad (Bou et al., 2011)

#### III.1.4.4.- Métodos proteómicos

La espectrometría de masas MALDI-TOF permite la identificación de microorganismos basado en el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada género y especie (Maldonado et al., 2018).

El procedimiento consiste en tomar con un palillo una porción pequeña de una colonia bien aislada del microorganismo, la cual es colocada directamente sobre una placa metálica conductora. Para microorganismos cuya lisis es más difícil, como ciertas bacterias Gram-positivas y micobacterias, levaduras y hongos, a menudo se requiere un tratamiento previo con un ácido orgánico fuerte como el ácido fórmico o por lisis mecánica. Posteriormente, a la placa con el microorganismo se adiciona una solución saturada de un compuesto orgánico de baja masa, denominada matriz. Generalmente es el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico. Luego se dejan secar. Después de la cristalización de la matriz y el material microbiano, la placa de metal se introduce en el espectrómetro de masas y se bombardea con pulsos de rayos láser de 337 nm. Las moléculas ionizadas se

aceleran a través de un campo electrostático y son expulsadas a través de un tubo de vuelo de metal sometido a vacío hasta que alcanzan un detector, los iones más pequeños viajan más rápido que los iones más grandes, por lo tanto, los analitos son separados para crear un espectro de masas que está compuesto por picos masa a carga ( $m/z$ ) con intensidades variables. Un espectro es una firma del microorganismo, una huella química, llamada también huella digital de la masa de los péptidos (*peptide mass fingerprinting*) que se compara automáticamente con una base de datos para la identificación a nivel de género y especie. Los resultados son revisados con base en el valor de puntuación (Bruker) o nivel de confianza (Biomérieux) y, de ser aceptables, son posteriormente exportados o consignados en el sistema de información propio del laboratorio (Maldonado et al., 2018). Las ventajas de este método son facilidad de uso, no requiere procedimiento previo de extracción, lo cual lo hace que la identificación sea más rápida, tiene una gran sensibilidad (picomoles o femtomoles) y es reproducible (Rose et al., 1999). Para identificar microorganismos se puede hacer directamente con una colonia bacteriana. Compara el perfil o huella espectral desconocida frente a las de bacterias conocidas con bases de datos previas, identifica los microorganismos a nivel de género y especie, en ocasiones puede determinar subespecies, y la reproducibilidad del análisis es elevada (Bou et al., 2011). Dentro de los sistemas comerciales se encuentran MicrobeLynx™ de Waters Corporation, MALDI Biotyper™ de Bruker Daltonics, AXIMA@SARAMIS™ de Shimadzu & Anagnostec. y MS-ID de bioMérieux (Figura 4).



**Figura 4.** Diagrama de flujo de diferentes enfoques utilizados para el estudio de la diversidad bacteriana mediante métodos dependientes e independientes de cultivo

### III.2.- Métodos independientes de cultivo

Los métodos independientes del cultivo son aquellos que no requieren el cultivo de los microorganismos. Se estima que solo el 1% de bacterias son cultivables mediante técnicas estándar (Vartoukian et al., 2010). La necesidad de aislar y cultivar bacterias ha sido reemplazada por la capacidad de extraer material genético presente en muestras de cualquier nicho ecológico, compararlo, analizarlo e identificarlo (Srivastava et al., 2019; Cornejo-Romero et al., 2014). La extracción de material genético es un punto clave para el éxito de estos métodos. Existen bacterias Gram positivas cuya pared es difícil de romper por métodos químicos como la utilización de proteínas K y lisozima, por lo cual se deben evaluar dichos procedimientos (Van Tongeren, et al., 2011). Además, se tiene que tener en cuenta la matriz, ya que el contenido de grasa, de proteínas, azúcares, ácidos pueden afectar la extracción de ADN. Se han diseñado diferentes kits para la extracción de ADN de alimentos, específicamente de derivados lácteos. Quigley et al. (2012a) compararon diferentes métodos de extracción de ADN en queso de leche cruda concluyeron que el kit de aislamiento de ADN microbiano MoBio PowerFood™ obtuvo mayores rendimientos en la extracción en comparación con otros métodos de extracción de ADN para la recuperación de ADN puro y altamente concentrado que luego podría utilizarse para la detección precisa de patógenos transmitidos por los alimentos mediante PCR cuantitativo. El mismo kit de extracción de ADN proporcionó resultados satisfactorios en estudios de comunidades microbianas realizados con leches y queso (Carafa et al., 2019; Lima et al., 2018; Kable et al., 2016; Quigley et al., 2013).

#### III.2.1.- Huella genética de una comunidad (*Genetic fingerprinting*)

La huella genética hace referencia al perfil genético (genotipo) de un individuo o grupo de individuos. Son métodos generalmente basados en la extracción de ADN, amplificación por PCR y separación electroforética. Entre ellas encontramos análisis de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE), electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE), polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), polimorfismo de longitud

de fragmento de restricción terminal (T-RFLP), y análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado (ARDRA), entre otros (Srivastava et al., 2019; Ndoye et al., 2011).

La técnica de DGGE consiste en la amplificación del ADN usando iniciadores específicos para grupos funcionales y/o taxonómicos, seguido de electroforesis en un gel de poliacrilamida. La separación del ADN se realiza en función de su movilidad en geles compuestos de concentración creciente de desnaturalizantes de ADN (urea y formamida). El mismo principio se sigue en TGGE, la única diferencia es que la desnaturalización se realiza un gradiente de temperatura. Estos métodos independientes del cultivo han sido rápidamente reconocidos como un enfoque valioso para el estudio de la biodiversidad. Permiten comparar los cambios espacio-temporales en la estructura de las comunidades bacterianas, es decir permite comparar rápidamente las comunidades microbianas presentes en muestras tomadas en diferentes sitios con ecosistemas similares y permite analizar una misma comunidad a lo largo del tiempo o en presencia de diferentes condiciones ambientales (Cornejo et al., 2014; Ndoye et al., 2011). Permite comparar abundancia y diversidad como también la variabilidad genética de genes diana en diferentes poblaciones mediante la recuperación de las bandas generadas en los perfiles para posteriormente ser manipulado y/o secuenciado. También estas técnicas pueden ser combinadas con otros métodos moleculares que proporcionen mayor información (Ndoye et al., 2011).

Sin embargo, son métodos dispendiosos, requieren mucho trabajo y equipos y reactivos costosos. Algunos reactivos son altamente tóxicos, generan secuencias cortas de ADN (500 pares de bases), lo cual hace que las inferencias filogenéticas se vean limitadas (Srivastava et al., 2019; Cornejo et al., 2014). También es posible que ocurra la co-migración de fragmentos de ADN, es decir, que dos secuencias diferentes de ADN compartan una misma posición en el gel. Esto puede inducir a una subestimación de la biodiversidad, del mismo modo que se dificulta la secuenciación del ADN recuperado de aquellas bandas en las que existe co-migración. También pueden presentarse errores en la PCR como amplificaciones preferenciales, formación de moléculas quiméricas y

heteroduplex (Cornejo et al., 2014).

La técnica de polimorfismo de conformación de una sola hebra (SSCP), se basa en el distinto comportamiento electroforético que presentan las moléculas monocatenarias de ADN en un gel de poliacrilamida. Sirve para el rastreo de mutaciones. Tiene como ventaja que se puede hacer un análisis simultáneo, reproducible y fiable de un gran número de muestras, no requiere ningún gradiente. Tiene como desventajas que se ve afectada por las condiciones de la PCR, no aporta información acerca de la mutación concreta que presenta el ADN, el ADN de cadena simple tiene más de una conformación estable posible, existe una alta tasa de re-anillamiento de las hebras de ADN después de una desnaturalización inicial durante la electroforesis (Srivastava et al., 2019).

T-RFLP es una técnica que consiste en la amplificación del ADN purificado usando PCR con una posterior digestión con enzimas de restricción específicas para generar fragmentos de ADN de longitudes diferentes. Los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en geles de agarosa. Lo cual genera perfiles diferentes (Ndoye et al., 2011). Esta técnica tiene como ventajas que permite el análisis simultáneo de un gran número de muestras, no requiere información previa de la secuencia del genoma que se desea analizar, proporciona un índice sólido de diversidad, altamente reproducible, para comparar diferencias entre comunidades microbianas. Asimismo, se pueden emplear distintas enzimas de restricción e iniciadores selectivos, lo que genera una ilimitada posibilidad de hallar polimorfismos. Tiene como desventaja que depende de una buena extracción de ADN y de una buena estandarización de la PCR, el tipo de Taq puede aumentar la variabilidad polimerasa, diferentes especies bacterianas pueden compartir la misma longitud en el gel, por lo cual no las puede distinguir (Srivastava et al., 2019; Cornejo et al., 2014).

RAPD es una técnica que consiste en la amplificación de segmentos de ADN con iniciadores cortos (generalmente de 10 nucleótidos de longitud) que se une complementariamente a regiones del genoma de manera aleatoria. Los amplicones generados son separados mediante un gel de electroforesis (Cornejo et al., 2014). La

ventaja de esta técnica es su rapidez, requiere poco ADN que además no necesita estar muy puro, no se requiere un conocimiento previo de la secuencia, y se pueden distinguir rápida y simultáneamente muchos organismos. Esta técnica tiene como desventaja que es altamente sensible a las condiciones de la PCR (temperatura de anillamiento, concentración de MgCl<sub>2</sub>, ADN molde usado e iniciadores utilizados. La técnica aumenta su sensibilidad y resolución cuando se utilizan varios conjuntos de iniciadores y se tiene bien estandarizadas las condiciones de la PCR (Cornejo et al., 2014; Ndoye et al., 2011).

ARDRA es una variante de la técnica de T-RFLP. Se basa en la amplificación de genes específicos del gen ARNr 16S, con la subsecuente digestión con enzimas de restricción. La mayor diferencia reside en el uso de iniciadores marcados con compuestos fluorescentes (4,7,20,70-tetracloro-6-carboxifluoresceína o 6-FAM (fluorocromo de fosforamidita) 5-carboxifluoresceína) para crear perfiles marcados con fluorescencia. Los fragmentos únicos generados son característicos de unidades taxonómicas operativas (UTOs) y se puede calcular la longitud y frecuencia de cada UTO mediante analizadores de frecuencia automatizados. Los analizadores de secuencia automatizados cuentan la longitud y frecuencia de las UTOs. Tiene como ventajas que permite obtener amplicones con tamaños superiores a 1000 pb, los perfiles de comunidades microbianas generados son altamente reproducibles, permite un monitoreo rápido de comunidades microbianas a lo largo del tiempo y una buena comparación de la diversidad microbiana en respuesta a las condiciones ambientales cambiantes. La técnica tiene como desventaja depende mucho de las condiciones de PCR, es difícil de resolver perfiles de restricción de comunidades microbianas complejas (Srivastava et al., 2019).

### III.2.2.- Hibridación *in situ* (*Fluorescence in situ hybridization, FISH*)

FISH es una herramienta molecular no basada en PCR que emplea sondas de oligonucleótidos dirigidas al ARN ribosomal para detectar y enumerar de forma rápida y fiable microorganismos específicos mediante microscopía fluorescente. FISH se puede utilizar para detectar directamente la presencia del patógeno en pequeñas muestras. Permite comparar los genomas de dos especies biológicas. Permite visualizar la distribución de esta especie específica dentro de un ambiente o nicho ecológico. También

puede determinar la diversidad taxonómica y funcional de una comunidad determinada. Tiene como desventaja que se debe de conocer la secuencia para diseñar la sonda, no diferencia entre células vivas o muertas (Srivastava et al., 2019; Ndoye et al., 2011).

### III.2.3.- Chips de ADN (*Microarrays*)

Los chips de ADN consisten en un conjunto ordenado de cadenas de ADN (sondas) de genes funcionales marcados con fluorescencia que están fijadas en una pequeña superficie denominada sustrato que puede ser de vidrio recubierto con grupos amino, aldehídos o epóxicos (Cornejo et al., 2014). También se puede emplear otro tipo de materiales como plástico, vidrio, gel, silicio, membranas porosas y oro. Las señales pueden evaluarse mediante microscopía de escaneo láser confocal determinar de manera cuantitativa la cantidad de genes (Srivastava et al., 2019). Para la aplicación de la técnica primero hay que realizar una selección del tipo de chip y de las secuencias que se colocarán en el soporte. Luego se tiene que obtener la muestra biológica. Posteriormente se hace la extracción y purificación del material genético (ADN o ARN). Luego se hace una amplificación del material genético (PCR), se realiza el marcaje de la muestra y a continuación se lleva a cabo la hibridación para finalmente capturar los datos y analizarlos (Delgado et al., 2011).

A diferencia de las técnicas basadas en PCR, permite estimar la diversidad funcional de una comunidad microbiana para miles de muestras en un corto período de tiempo permitiendo analizar un gran número de genes simultáneamente y de forma específica. Permite determinar simultáneamente no solo quien está en la comunidad, sino qué está haciendo, es decir si todos los genes de un organismo se están expresando o no en una condición determinada (Srivastava et al., 2019). Tiene como desventajas que es una técnica costosa, depende en gran medida de la longitud de la sonda de ADN, mientras más grandes sean las cadenas a evaluar, menos probabilidades hay de hibridización. Esto se puede corregir dependiendo del objetivo del estudio, cuando se buscan polimorfismos o mutaciones puntuales, se recomiendan las secuencias más cortas de tal manera que se reduzca la hibridación inespecífica. Las secuencias de mayor tamaño (varios cientos de

pares de bases) se emplean con mayor frecuencia en estudios de expresión de genes (Delgado et al., 2011).

La otra desventaja es el problema que acarrea el marcaje de las muestras, procedimiento que puede realizarse de manera directa e indirecta mediante fluorescencia, radiactividad, o fluorometría. Si se lleva de manera directa los fluorocromos van a interferir con la PCR, lo cual va a afectar el rendimiento en la obtención de los productos de amplificación. El uso de material radiactivo y la fluorescencia inespecífica en algunos soportes también hace parte de los problemas que se pueden presentar al utilizar esta técnica. El marcaje indirecto permite una mayor sensibilidad, pero aumenta el costo de la técnica. Otra desventaja que tiene esta técnica es que no se pueden observar valores absolutos en la expresión de genes, para ello se requiere una PCR cuantitativa (Srivastava et al., 2019; Delgado et al., 2011).

#### III.2.4.- PCR en tiempo real (*Real time PCR*)

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia, entre mayor concentración de ADN mayor es la intensidad de la fluorescencia. El procedimiento es similar que realizar un PCR convencional, con la diferencia que se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo, el cual permite medir el número de copias y la tasa de generación de nuevas moléculas de ADN. Los fluoróforos pueden ser de dos categorías: con afinidad por el ADN y sondas específicas para fragmentos del ADN. Los primeros emiten fluorescencia cuando se unen al ADN (por ejemplo, el SYBR Green). Estos fluoróforos son económicos, sin embargo, presenta varias desventajas, la señal de fluoróforo no es específica por lo tanto no permite el análisis de varios genes a la vez (Srivastava et al., 2019; Cornejo et al., 2014).

Los segundos solo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN de interés (blanco). Existen tres tipos sondas de hidrólisis, sondas de hibridación y sondas de horquilla. Todas se basan en la transferencia de energía entre dos fluoróforos,

un donador (reportero) y un aceptor (apagador o quencher), los cuales emiten fluorescencia a diferente longitud de onda (Cornejo et al., 2014).

Las ventajas de la utilización de la técnica PCR en tiempo real es que permite cuantificar el producto de la amplificación del ADN, es sensible, específica y rápida en la visualización del producto, ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. La desventaja de esta técnica es que es afectada por las ambigüedades y condiciones de la PCR, como la falta de una estandarización adecuada. Sólo se puede utilizar para la identificación de genes conocidos (Cornejo et al., 2014). Existe una variante de la PCR en tiempo real que utiliza una enzima denominada transcriptasa reversa. Esta PCR consiste en extraer el ARN de la muestra, luego mediante transcriptasa reversa el ARN es transformado en ADN de doble cadena. Esta técnica sirve para estudiar la expresión de genes transcritos y sus actividades. Esta técnica tiene como desventaja que requiere ARNm de buena calidad, lo cual es un gran desafío pues el ADN fácilmente se degrada en el medio ambiente. Por lo cual se tiene que ser más riguroso en la utilización del material y de los equipos, como en la estandarización de las condiciones de la técnica (Ndoye et al., 2011).

### III.2.5.- Métodos de secuenciación

La secuenciación es la determinación del orden de los nucleótidos en el ADN por métodos bioquímicos. La secuenciación tiene innumerables aplicaciones entre ellas el estudio de las comunidades y el descubrimiento de nuevos microorganismos. Tienen la ventaja de detectar microorganismos fastidiosos o células bacterianas en el estado viable pero no cultivable (O'sullivan et al., 2015; Quigley et al., 2012b). Permite la detección de genes asociados a metabolitos que tienen una aplicación biotecnológica (Alkan et al., 2011). Permite estudiar la relación existente entre el hospedador y microorganismo en estados diferentes de salud o etapas de crecimiento (Kurokawa et al., 2007). Mediante estas técnicas se obtienen cantidades de datos mayores (Giga o Tera bases de nucleótidos) a procesar que corresponden al total de organismos existentes en ese ambiente. No cabe duda del potencial que tiene la secuenciación. Sin embargo, hay que aclarar que esta

técnica tiene sus limitaciones como el excesivo volumen de datos genómicos obtenidos, la capacidad de almacenamiento de las computadoras donde se procesa la información, la dificultad en la interpretación de resultados lo cual solo lo puede hacer personas con experiencia y conocimiento suficiente y la obtención de un gran número de resultados inesperados, posible contaminación o nuevas inserciones, duplicaciones de segmentos, pérdida de fragmentos en la lectura de genes o genomas y cambios de algoritmos utilizados entre un tipo de secuenciador y otro (Behjati & Tarpey, 2013). Las técnicas de secuenciación tienen en común los siguientes pasos: extracción de ADN, preparación de bibliotecas, reacción de secuenciación, y análisis de datos. Sin embargo, son diferentes por la combinación única de protocolos específicos que cada una presenta, lo cual se ve reflejado en la cantidad y calidad de datos, como en el costo de la secuenciación (Alkan et al., 2011; Metzker, 2010; Wold & Myers, 2008). Existe varios tipos de secuenciación como la secuenciación Sanger y las plataformas de secuenciación denominadas secuenciación de nueva generación (Behjati & Tarpey, 2013).

#### III.2.5.1.- Secuenciación Sanger

Se basa en la interrupción controlada de la replicación del ADN *in vitro*. El ADN es fragmentado y luego es clonado en un plásmido vector. Se realiza una PCR del fragmento que se va a secuenciar, pero, a diferencia de una PCR convencional, se utiliza un solo iniciador y se agregan dideoxynucleótidos (ddNTPs) (nucleótidos que tienen un hidrógeno en vez de un grupo hidroxilo en la ribosa, en el extremo 3' del ADN) que están marcados con radiactividad ( $P^{32}$ ) o con fluoróforos. Cuando se incorpora un dideoxynucleótido a la cadena en elongación, se termina su amplificación, de tal manera que al final, se tienen fragmentos de diferente longitud, cada uno terminando en un ddNTPs. Los fragmentos obtenidos, se separan y analizan electroforéticamente de manera manual o automática (Cornejo et al., 2014). Una de las ventajas que tiene este método es que puede leer fragmentos entre 400-900 nucleótidos, tiene un 99% de exactitud, sin embargo, la secuenciación Sanger es mucho más lenta, produce menos información (Gigabases por corrido) y es más costosa que las nuevas técnicas de secuenciación. Según Behjati y Tarpey (2013), el genoma humano fue secuenciado por el método Sanger casi

en su totalidad en 10 años, con las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento puede realizarse en un día. Además, en la secuenciación Sanger se presentan uniones no específicas del cebador al ADN, que afectan a la correcta interpretación de la secuencia de ADN, la estructura secundaria interna de la cadena de ADN molde o ARN que pueda actuar de cebador al azar, también el método es propenso a la contaminación con ADN exógeno o inhibidores de la enzima ADN polimerasa (Figura 4).

### III.2.5.2.- Secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*)

Las técnicas de secuenciación han sido modificadas y perfeccionadas en el tiempo a pasos agigantados, todo con el fin de aumentar su capacidad de lecturas en un menor tiempo y a un menor costo. Por ello, han recibido el nombre de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. La secuenciación de alto rendimiento se ha convertido en un potente enfoque independiente de cultivo que se puede utilizar para obtener, “snapshots” de comunidades microbianas de sistemas alimentarios. En la industria láctea, se han llevado numerosos estudios basados en tecnologías *Next Generation Sequencing* (NGS) con diferentes propósitos (Yeluri et al., 2018), por ejemplo, para descifrar la microbiota de ambientes de granja y animales (Frétin et al., 2018), leche cruda y pasteurizada (Quigley et al., 2013), tanques de transporte, cubas, utensilios e instalaciones de producción de queso (Falardeau et al., 2019; Kable et al., 2016) y las variaciones asociadas a la temporada o al clima (Kable et al., 2016), a la alimentación animal (Giello et al., 2017), para establecer cómo se relacionan las comunidades microbianas en las materias primas, el medio ambiente y el producto terminado (Falardeau et al., 2019; Bokulich & Mills, 2013), para estudiar los cambios en las comunidades bacterianas asociadas con la elaboración de queso (Giello et al., 2017; Aldrete-Tapia et al., 2014) y los procesos de maduración del queso (Giello et al., 2017; Porcellato & Skeie, 2016; Silvetti et al., 2017), o para determinar la composición microbiana de quesos y variedades de queso (Dugat-Bony et al., 2016; Kamimura et al., 2019). Además, los estudios de secuenciación masiva también pueden proporcionar información sobre la microbiota adventicia, la presencia de bacterias patógenas y/o de deterioro en el ambiente de quesos y lácteos (Quigley et al., 2012b; Yeluri et al., 2018; Aldrete-Tapia et al., 2014; Riquelme et al.,

2015; O'Sullivan et al., 2013; Dalmaso et al., 2016). Entre ellas se encuentran las plataformas 454 Life Sciences de Roche®, las plataformas de Life Technologies el SOLiD® (por sus siglas en inglés “Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection”), las diferentes, Ion Torrent™ GeneStudio S5, plataformas de Illumina® (Solexa) GA/HiSeq/MiSeq/NextSeq y PacBio RS® (Pacific Biosciences).

Las plataformas NGS tienen como ventaja que no es necesario usar geles lo que supone una mayor rapidez y un menor coste que la secuenciación de Sanger. Las técnicas de secuenciación tienen en común los siguientes pasos: extracción de ADN, preparación de bibliotecas, reacción de secuenciación y análisis de datos. Sin embargo, en general se diferencian por el tipo de PCR y el modo de detección. Para la construcción de la librería en primer lugar, el ADN es extraído y luego es fragmentado, lo cual es común para todas las plataformas de secuenciación. Luego al ADN fragmentado se le adiciona unos adaptadores. Los adaptadores son secuencias de ADN comunes o universales, los cuales se unen o “ligan” de manera aleatoria a los extremos de las hebras del ADN fragmentado. La preparación resultante se denomina librería de secuenciación. Estos adaptadores a su vez unen el ADN en una superficie sólida y definen el sitio en la cual la reacción de secuenciación iniciará. A esto se le llama inmovilización (Pacheco et al., 2015).

Posteriormente (con excepción de la plataforma PacBio RS®), la librería de secuenciación se amplifica por PCR. El objetivo de la PCR es intensificar la señal antes de la reacción de secuenciación (Pacheco et al., 2015). Las NGS se diferencian por el tipo de PCR. La PCR puede ser de dos tipos, PCR en emulsión o PCR en puente. La PCR por emulsión consiste en mezclar los fragmentos de ADN en micromicelas ubicadas en una emulsión de aceite en agua, con unas microesferas que está recubierta de adaptadores complementarios a los adaptadores del fragmento y una polimerasa que iniciará la PCR. La hebra original se hibrida con los adaptadores ubicados en la microesfera con el objetivo de ser copiada o amplificada. Después de la amplificación, se retiran todas las hebras complementarias y dejan solo las hebras con los adaptadores ligados a la microesfera, finalmente se obtiene miles de copias de un mismo fragmento de ADN (Rubio et al., 2020). Este tipo de PCR se emplean en la secuenciación GS FLX+ y SOLiD 5500xl (Tabla 5).

**Tabla 5.** Características de los métodos de secuenciación de nueva generación

Características	GS FLX+ (454 Life Sciences, Roche)	SOLiD 5500xl (Allseq)	Ion Torrent™	Hiseq 2500 (Solexa Illumina)	PacBio RS® (Pacific Biosciences)
Adaptadores	Lineales	Lineales	Lineales	Lineales	De burbujas
Soporte	Placa picotituladora	Celdas de flujo	Celdas de flujo	Celdas de flujo	Guías de onda en modo cero
Tipo de PCR	Emulsión	Emulsión	Emulsión	Puente PCR	No, se hace por molécula única
Reacción de secuenciación	Síntesis	Ligación	chip semiconductor	Síntesis	Síntesis en tiempo real
Métodos de detección	Pirosecuenciación	Sondas de oligonucleótidos marcados con fluorescencia	Ion 510™ Chip	Terminadores reversibles marcados con fluorescencia	Nucleótidos marcados con fluorescencia fosfovinculados
Longitud de lectura (pb)	700	2x60	200	2x125	1000
Exactitud (%)	99	99	99	98	99
Lecturas por corrida (Gb)	1	95	0,1	450-500	1
Tiempo (h)	23	>72	4,5	72	0,5-4

La PCR en puente consiste en colocar los fragmentos de ADN sobre una superficie sólida de vidrio separada por carriles. Cada carril está completamente recubierto por oligonucleótidos complementarios a los adaptadores de cada fragmento que se va a secuenciar, por lo que permiten que cada fragmento se pueda anclar a la celda de flujo. Una vez anclados los segmentos, la polimerasa inicia el proceso de copia en la hebra de ADN y genera una hebra reversa complementaria. La hebra original es entonces retirada; mientras que la hebra reversa, a través de una secuencia terminal, se pliega y se ancla a su respectiva secuencia complementaria de oligonucleótido, y así queda en forma de puente. Posteriormente, la polimerasa genera una hebra complementaria idéntica a la original, que resulta en dos hebras clonadas del segmento inicial. Este proceso se repite masivamente hasta formar millones de copias de cada fragmento (Rubio et al., 2020).

Las plataformas de secuenciación también se diferencian por el proceso de detección, el cual es específico para cada plataforma (Tabla 5). Para la plataforma 454 Life Sciences de Roche®, se hace PCR por emulsión y la detección se hace captando la emisión de luz producida por unas enzimas cuando se liberación de pirofosfatos

(pirosecuenciación), durante la extensión por polimerización de la cadena de ADN. Este método fue el primer método NGS, ha sufrido modificaciones a través de los años. Hoy en día está siendo discontinuado debido a su incapacidad de competir con las nuevas plataformas de secuenciación (López de Heredia, 2016).

La plataforma de secuenciación SOLiD de Life Technologies (ahora ThermoFisher) utiliza PCR en emulsión (emPCR) y un enfoque de secuenciación por ligadura que genera resultados en "espacio de color". Para la detección se utilizan sondas de oligonucleótidos marcados con fluorescencia. Si bien no han discontinuado oficialmente la plataforma, ya no la promocionan activamente y no parecen estar desarrollándola o vendiendo nuevos instrumentos (SOLiD ThermoFisher AllSeq, 2020). Ion Torrent<sup>TM</sup> utiliza PCR en emulsión con microesferas. La detección se lleva a cabo por cambio de pH, el cual es detectado mediante un ion semiconductor el cual está en cada pocillo. Cuando un nucleótido es ligado a la hebra que se va a secuenciar, se forma un enlace covalente y se libera un ion de hidrógeno ( $H^+$ ), el cual produce un cambio en el pH de la solución del pocillo y se genera una corriente eléctrica. Para la identificación del tipo de nucleótido agregado, inicialmente se inserta solo un tipo de base en el pocillo y el sensor detectará o no el voltaje dependiendo de la complementariedad de la base. Si esta no es complementaria, se agrega otro nucleótido hasta que se detecte voltaje. En esta técnica, los nucleótidos no están modificados con terminadores reversibles, por lo que en caso de que haya homopolímeros (dos o más nucleótidos iguales que se repiten), el pH disminuirá en mayor proporción y la diferencia de voltaje aumentará proporcionalmente al número de bases añadidas (Rubio et al., 2020; Goodwin et al., 2016).

En las plataformas de Illumina® (Solexa) GA/HiSeq/MiSeq/NextSeq, la detección se basa en la incorporación de nucleótidos marcados con terminadores reversibles de manera que, en cada ciclo de ligación, solamente uno de los cuatro nucleótidos posibles se une de forma complementaria al ADN molde, emitiendo una señal luminosa que es captada por un sistema óptico altamente sensible. Posteriormente, el terminador es eliminado para permitir la incorporación del siguiente nucleótido en ciclos sucesivos de secuenciación. Estas plataformas son las más empleadas actualmente para la

secuenciación de ácidos nucleicos debido a su buena relación coste-beneficio. Cabe resaltar que la plataforma Illumina Hiseq es la que genera más información (500 gigabases por corrida) (Rubio et al., 2020).

Una de las desventajas de la secuenciación mediante las plataformas Illumina Hiseq 2500 (Solexa Illumina) y SOLiD 5500xl (Allseq), es la baja resolución taxonómica en comparación con la secuenciación Sanger. Las lecturas arrojadas por NGS son más cortas (aproximadamente 300 pb dependiendo del sistema utilizado), por lo tanto, proporcionan una resolución al máximo hasta el nivel de género, por lo cual es insuficiente para aquellos géneros que comprenden especies patógenas o son de relevancia tecnológica para el proceso de elaboración del queso (Tabla 5). Esta desventaja puede ser compensada cuando se utiliza técnicas dependientes de cultivo acompañadas de secuenciación del ADNr 16s. La combinación de ambos enfoques puede ser usado para describir la contribución de microorganismos individuales encontrados en el queso (dependiente del cultivo) y para determinar la diversidad y el dominio de los microbios poblaciones o especies (independientes del cultivo) así como la actividad microbiana.

Existe otras plataformas denominadas de tercera generación, las cuales no requieren reacciones de PCR. Ello economizaría más tiempo y evitaría las ambigüedades que se producen en esta. Entre ellas se encuentra la plataforma de secuenciación denominada PacBio RS® (Pacific Biosciences), la cual es capaz de secuenciar pequeños fragmentos de ADN miles de veces con gran precisión y leer secuencias de ADN que tengan un largo de entre 1,000 bases, esta característica le permite superar los inconvenientes que tienen otras plataformas de secuenciación masiva como Illumina. Otra ventaja es que cada lectura del PacBio® costaría menos de lo que cuesta una corrida en las actuales plataformas (Goodwin et al., 2016) Existen otras plataformas que no requieren PCR como nanopore y otros sistemas que se encuentran en fase de desarrollo como Helicos, Stratos, el sistema de transferencia energética de resonancia de la fluorescencia FRET (López de Heredia, 2016).

## **IV.- OBJETIVOS**

#### **IV.1.- GENERAL**

- Determinar la biodiversidad bacteriana del queso Paipa mediante el uso de las tecnologías dependientes e independientes de cultivo.

##### **IV.1.1.- ESPECÍFICOS**

- Determinar la biodiversidad bacteriana del queso Paipa durante el período de maduración.
- Evaluar la calidad microbiológica del queso Paipa comercializado por empresas formales e informales mediante el recuento de bacterias cultivables y la caracterización de los aislamientos potencialmente patógenos presentes en el queso Paipa.
- Seleccionar y caracterizar bacterias ácido lácticas productoras de sustancias antimicrobianas contra bacterias potencialmente patógenas aisladas del queso Paipa.
- Purificar parcialmente y caracterizar las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias ácido lácticas seleccionadas.

## **V.- MATERIALES Y MÉTODOS**

## **V.1.- Análisis de la diversidad bacteriana del queso Paipa por secuenciación masiva**

### V.1.1.- Muestreo de los quesos

El queso Paipa fue elaborado por productores formales locales a partir de leche cruda de vaca mediante coagulación enzimática y moldeo a mano, siguiendo el procedimiento estándar descrito en la normativa colombiana para la denominación protegida del origen del queso (SIC-Colombia, 2011). La maduración se realizó sobre estantes de madera ubicados en cuartos con condiciones naturales (temperaturas locales de 12-20°C, humedad relativa 60%–70 %) con volteo diario del queso a mano. Las muestras de queso fueron proporcionadas por tres productores locales de queso (C, A, F) en el año 2018. Para cada productor, se realizaron dos muestras (A y B) en dos quesos de diferentes lotes de producción que se prepararon con aproximadamente un mes de diferencia. Los muestreos se realizaron a los 0, 10, 21 y 28 días de maduración. Brevemente, las rodajas radiales (ca. 100 g de peso cada una) se separaron asépticamente de los quesos con un cuchillo estéril y se depositaron, en condiciones asépticas, dentro de bolsas de plástico con cierre de cremallera. Las bolsas se almacenaron a 4°C y luego se transportaron al laboratorio sobre hielo. Las muestras se almacenaron congeladas a -20°C hasta el análisis.

### V.1.2.- Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando un kit de aislamiento de ADN microbiano PowerFood™ (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante para extraer ADN de microorganismos no cultivables de los alimentos (Quigley et al., 2012a). Las bolsas con cierre de cremallera que contenían las muestras de queso se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se colocaron dentro de bolsas Stomacher. Las muestras de queso dentro de las bolsas dobles primero se rompieron en trozos pequeños frotando a mano y luego fueron homogenizadas durante 1 minuto en un Stomacher 400 (Seward, Reino Unido). Para cada muestra de queso, se utilizaron dos porciones de 0,25 g del homogenizado y el ADN extraído se agrupó en un solo tubo de ensayo. La calidad y cantidad del ADN extraído de los microorganismos se determinó utilizando el sistema QuantiFluor® ONE

dsDNA (Promega, Madison, WI, USA). El ADN se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis.

#### V.1.3.- Secuenciación de ADN

Los amplicones del gen 16S ADNr se obtuvieron siguiendo el protocolo Illumina de la biblioteca de secuenciación metagenómica del gen 16S rDNA (Cod. 15044223 Rev. B). Las secuencias específicas genéticas utilizadas en este protocolo se dirigen a la región V3 y V4 del gen 16S ADNr. Se agregaron secuencias de nucleótidos salientes del adaptador Illumina a las secuencias específicas de genes. Los *primers* fueron seleccionados de (Klindworth et al., 2013). Se utilizaron las siguientes secuencias de los *primers* para la amplificación del gen ARNr 16S: *forward primer*: 5'TCGTCGGCAGCGTAGATGTATAAGAGACCCCCNGNGGCWGCAG; *reverse primer*: 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC. Para iniciar el protocolo se utilizó ADN genómico microbiano (5 ng/ $\mu\text{L}$  en 10 mM Tris pH 8,5). Después de la amplificación del gen 16S rADN, el paso de multiplexación se realizó utilizando un kit Nextera XT (FC- 131-1096). Se analizó una cantidad de 1  $\mu\text{L}$  del producto PCR en un chip Bioanalyzer DNA 1000 para verificar el tamaño (tamaño esperado de 550 bp). Después de la verificación del tamaño, las bibliotecas se secuenciaron por extremos emparejados de 2 x 300 pb (MiSeq Reagent kit v3, MS-102-3001) en un secuenciador MiSeq, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina, Inc., San Diego, CA., EE. UU.). La evaluación de la calidad se realizó utilizando el programa prinseq-lite (Schmieder et al., 2011).

#### V.1.4.- Análisis de las secuencias de ADN

Los datos de la secuencia se analizaron utilizando qiime2 Pipeline (Caporaso et al., 2011). La eliminación de ruido y quimeras y la unión de fragmentos emparejados se realizaron utilizando DADA2 Pipeline (Callahan et al., 2016). Las afiliaciones taxonómicas fueron asignadas usando el clasificador bayesiano integrado en los plugins qiime2 y la base de datos SILVA\_release\_132 (Quast et al., 2013). El análisis estadístico se llevó a cabo con la versión 24 del software SPSS (IBM Corp., Foster City, CA, EE. UU.). Tanto la secuenciación como el análisis de las secuencias fueron realizados por un

servicio externo. Los archivos de correspondientes a las secuencias se depositarán en el servicio Sequence Read Archive (SRA) de la base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) con el número de acceso PRJEB36556.

## **V.2.- Evaluación de la calidad microbiológica del queso Paipa comercializado por empresas formales e informales**

### V.2.1.- Recuento de bacterias potencialmente patógenas presentes en el queso Paipa

#### V.2.1.1.- Muestreo de los quesos

En los puntos de venta del municipio de Paipa, se compraron muestras de 500 g de queso de dieciséis empresas, ocho de productores informales y ocho de productores formales durante los años 2015, 2016 y 2017. Los quesos Paipa se maduraron durante 21 días antes de la venta. Los quesos fueron transportados al laboratorio y refrigerados a 4°C durante 24 h.

#### V.2.1.2.- Recuento de las poblaciones microbianas

Las muestras de queso (10 g) se homogeneizaron en 90 mL de solución salina fisiológica (0,85% NaCl) en un Stomacher (Blender). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas en base 10, hasta  $10^{-8}$ . Las homogenizados de queso resultantes se utilizaron para análisis microbiológicos de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, estafilococos, y coliformes totales y fecales (Madigan et al., 2010).

##### V.2.1.2.1.- Recuento de aerobios mesófilos

Los aerobios mesófilos totales se determinaron por el método de recuento en placa profunda por triplicado en el agar Standar Plate Count (Oxoid, USA). Las cajas fueron incubadas 35°C durante 48 h. Pasado este tiempo se realizó el recuento según la Norma Técnica Colombiana 4092 (ICONTEC, 2009).

#### V.2.1.2.2.- Recuento de mohos y levaduras

Los mohos y las levaduras se determinaron por recuento en placa en agar patata dextrosa (PDA) suplementado con 30 mg/L de cloranfenicol por triplicado. Las cajas fueron incubadas 25°C durante 8 días. Pasado este tiempo se realizó el recuento según la Norma Técnica Colombiana 4092 (ICONTEC, 2009).

#### V.2.1.2.3.- Recuento de estafilococos

*Staphylococcus* sp. se determinó por recuento en placa con confirmación posterior. El recuento se realizó por triplicado. Para ello se sembraron 0,1 mL de las diluciones (hasta  $10^{-4}$ ) en agar salado manitol. Las cajas se incubaron a 35°C durante 24 h (ISO, 1999). Para *Staphylococcus* sp., se aislaron cinco colonias presuntivas por muestra en agar salado Manitol (Sharlau, España). Se les realizó la prueba de la coagulasa tradicional para su confirmación posterior. Para la prueba de la coagulasa, se inoculó una asada de la colonia bacteriana presuntiva y se inoculó en tubos con 2 mL de plasma (obtenido por centrifugación de sangre a 6000 rpm). Posteriormente los tubos se incubaron a 37°C durante 6 h. Luego se corrigió el recuento según la norma técnica colombiana 4092 (ICONTEC, 2009). Se seleccionaron los aislamientos que dieron positivo para la prueba de la coagulasa.

#### V.2.1.2.4.- Recuento de coliformes totales y fecales

Los coliformes totales y fecales fueron determinados por la técnica de tubos múltiples de fermentación (NMP/mL). Para ello se sembró 1 mL de las diluciones  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$  por triplicado en caldo LMX Fluorocult® (Merck 110620, Alemania). Los tubos luego fueron incubados a 35°C durante 24 h. Posteriormente se realizó la lectura de los tubos utilizando la tabla del número más probable para tres diluciones de la norma técnica colombiana 4092 (ICONTEC, 2009). Para coliformes, se replicó un tubo positivo de caldo LMX fluorocult por muestra en agar EMB y Agar Chromocult coliformes (Merck 110426,

Alemania). Las cajas de Petri se incubaron a 37°C y 42°C durante 24 h. Se seleccionaron todos los aislamientos que crecieron en estos dos agares (APHA et al., 2012).

#### V.2.1.2.5.- Recuento de *Listeria monocytogenes*

Para *L. monocytogenes* se pesaron 25 g de queso y se depositaron en 225 mL de caldo Fraser estéril (Sharlau, España). Luego la solución se incubó a 4°C durante 15 días. Pasado este tiempo 0,1 mL del caldo Fraser fue sembrado por agotamiento en agar Palcam (Oxoid, USA) a 30°C por 48h. Las colonias presuntivas fueron luego confirmadas por prueba rápida Singlepath® L'mono (Merck 104148, Alemania) Se seleccionaron los aislamientos que dieron positiva la prueba confirmativa (ISO, 2017a).

#### V.2.1.2.6.- Recuento de *Salmonella* sp.

Para *Salmonella* sp. se pesaron 25 g de queso, luego se depositaron en 225 mL de agua peptona estéril. Posteriormente esta solución se incubó a 37°C por 24 h. Pasado el tiempo de incubación, 1 mL del pre-enriquecimiento fue inoculado en 10 mL de caldo de Rappaport Vassiliadis (Sharlau, España). Esta solución fue incubada a 42°C durante 24 h. Pasado el tiempo de incubación 0.1 mL del caldo Rappaport fue sembrado por agotamiento en el agar XLD (Sharlau, España) a 37°C por 24 h. Las colonias presuntivas luego fueron confirmadas mediante la prueba rápida Singlepath® Salmonella (Merck 104140, Alemania). Se seleccionaron las colonias que dieron positivo para la prueba confirmativa (ISO, 2017b).

#### V.2.1.3.- Conservación de los aislamientos bacterianos

Todos los aislados seleccionados fueron cultivados en agar nutritivo a 37°C durante 24 h y conservados a -80°C en crioviales con caldo BHI estéril suplementado con glicerol al 40%.

## V.2.2.- Identificación de los aislamientos por secuenciación del gen ARNr 16S

La identificación de los aislados bacterianos se llevó a cabo mediante la amplificación y el análisis de la secuencia del gen para el ARNr 16S. Las cepas se cultivaron en agar nutritivo a 30°C durante 24 h.

La extracción total de ADN se realizó utilizando el kit de extracción Xtrem, siguiendo las instrucciones del fabricante (Xtrem-Biotech, 2018). Todas las extracciones se visualizaron con Midori Green en un transiluminador de luz ultravioleta, después de realizar electroforesis horizontal en gel de agarosa del 1,0% (Advance Tin Stain Catalog M604, NIPPON Genetics Europe GmbH).

La pureza del ADN se evaluó utilizando un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc) midiendo la relación de absorbancia a 260/280 nm (Quigley et al., 2012a).

Posteriormente, se amplificó el gen casi completo del gen para el ARN ribosómico 16S por reacción en cadena de polimerasa (PCR), utilizando los cebadores 27F (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). La composición general de la mezcla de amplificación fue la siguiente (volumen final 50 µl): 2 µL de ADN diana (10 ng/L), 6 µL de los desoxinucleótidos trifosfato (200 µM), 2,5 µL de cada cebador (10 pmol /L), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (100 mM), 5 µL del tampón de polimerasa Taq (10X), 0,25 µL de Taq polimerasa (5 U/µL) y 31 µL de agua estéril Milli Q (Invitrogen, Milán, Italia). Las condiciones de PCR fueron una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 96°C para 10 s, 30 ciclos de recocido a 52°C para 30 s, 30 ciclos de extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C durante 4 minutos.

Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 1% con un marcador de peso molecular de 1 kb a 80 V durante 20 minutos. Luego fueron purificados con la enzima ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences) y secuenciados por Sistemas Genómicos Ascires Biomedical Group (Valencia, España). Los

electroferogramas se analizaron utilizando el software BioEdit y las secuencias de nucleótidos de consenso obtenidas se compararon utilizando la herramienta BLAST con las secuencias de referencia almacenadas en NCBI (Alzohairy, 1991; Zhang et al., 2000).

#### V.2.3.- Susceptibilidad a los antimicrobianos

La susceptibilidad a los antibióticos por parte de las cepas de *S. aureus* y coliformes se evaluó mediante el método de difusión en disco (CLSI, 2019).

Los antibióticos analizados para *S. aureus* fueron penicilina (P, 10 µg), clindamicina (DA, 10 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), amikacina (Ak, 30 µg), cloranfenicol (C, 30 µg), trimetropin Sulfa (SXT, 25 µg), norfloxacin (NOR, 5 µg), cefoxitina (FOX, 30 µg), ciprofloxacino (CIP, 5 µg) y levofloxacino (LEV, 5 µg).

Los antibióticos analizados para coliformes fueron: tetraciclina (TE, 30 µg), amikacina (Ak, 30 µg), cloranfenicol (C, 30 µg), trimetoprim Sulfa (SXT, 25 µg), norfloxacin (NOR, 5 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), ertapenem (ETP, 10 µg), imipenem (IPM, 10 µg), cefoxitina (FOX, 30 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg), ceftriaxona (CRO, 30 µg), ciprofloxacino (CIP, 5 µg), levofloxacino (LEV, 5 µg), ácido ceftazidime-clavulánico (Caz-Cla), gentamicina (CN, 10 µg) y ácido nalidixico (NA, 30 µg).

Las cepas de *L. monocytogenes* se evaluaron por método de concentración mínima inhibitoria (CLSI, 2019). Los antibióticos evaluados para *L. monocytogenes* fueron penicilina (P, 10 µg), eritromicina (E, 15 µg), vancomicina (VA, 30 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), trimetropin-Sulfa (SXT, 25 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), ciprofloxacino (CIP, 5 µg), levofloxacino (LEV, 5 µg) y gentamicina (CN, 10 µg). Los antibióticos utilizados fueron marca Oxoid (Basingstoke, Reino Unido).

#### V.2.4.- Susceptibilidad a los biocidas

La susceptibilidad a los biocidas para las cepas potencialmente patógenas que

fueron multi-resistentes a antibióticos, se evaluó utilizando el método de microdilución en placa (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). Los biocidas Cetrimida (C), digluconato de clorhexidina (CL), cloruro de benzalconio (BC), hexaclorofeno (HC), cloruro de hexadeciridinio (HP) y triclosán (T) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Las diluciones de cada biocida en TSB (caldo de soja tríptico, CM0129) fueron inoculadas al 1 % (v/v) con cultivos overnight de las cepas bacterianas en TSB. El experimento se realizó por triplicado. Se incluyeron controles de crecimiento para cada bacteria. Las placas de microtitulación se incubaron a 37°C durante 24 h. Luego, se midió la densidad óptica (OD-595 nm) con un lector de microplacas iMark (BioRad, Madrid). Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) a 24 h se definieron como la concentración más baja en la que el crecimiento se inhibió por completo ( $DO \leq 0,05$ ) (Fernández et al., 2017).

### **V.3.- Selección y caracterización de bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana contra bacterias potencialmente patógenas aisladas del queso Paipa**

#### V.3.1.- Recuento y aislamiento de bacterias ácido lácticas

Para el análisis de BAL, se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-7}$  de los quesos anteriormente muestreados, luego los homogenizados de las diluciones fueron sembrados en agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Sharlau 02-135-500) por triplicado. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 72 h. Posteriormente se hizo el recuento según la Norma Técnica Colombiana 4092 y se aislaron los diferentes morfotipos observados (ICONTEC, 2009).

#### V.3.2.- Selección de las bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana

Los aislados a partir del agar MRS fueron evaluados mediante las pruebas oxidasa, catalasa, morfología, tinción de Gram y actividad antimicrobiana mediante prueba de difusión en pocillos de agar (Balouiri et al., 2016; Chandrasekar et., 2015).

#### V.3.2.1.- Prueba oxidasa

La actividad oxidasa se evaluó mediante tiras de oxidasa (Bactident® Oxidasa, Merck, Germany). Para ello, se tomó una tira de oxidasa, luego se escogió la colonia que creció previamente en agar MRS a 25°C durante 48 h, una muestra de esa colonia se tomó con un palillo de madera estéril y se frotó de forma circular el papel de filtro. Pasados 30 segundos se comparó con la escala de colores que trae el producto (Madigan et al., 2010).

#### V.3.2.2.- Prueba catalasa

Para evaluar la actividad catalasa se agregó una gota de peróxido de hidrógeno al 30 % en un portaobjetos limpio. Luego, se tomó una porción de la colonia (la misma con la que se hizo la prueba oxidasa) con un palillo de madera estéril y se frotó de forma circular con la solución de peróxido de hidrógeno (Madigan et al., 2010).

#### V.3.2.3.- Características microscópicas

Para cada aislado por separado se tomó una lámina portaobjetos limpia, posteriormente se agregó una gota de NaCl al 0,85 % en el centro de la lámina. Luego se tomó una muestra muy pequeña de la colonia. Se realizó un frotis de la misma extendiéndola sobre la lámina. Se dejó secar al aire por un minuto. Se tomó la lámina por uno de sus extremos y se flameó sobre el mechero 3 veces. Luego, se le agregó cristal violeta por 1 minuto, Posteriormente se enjuagó con agua de grifo. Posteriormente se agregó lugol por 1 minuto y se volvió a enjuagar con agua de grifo. Posteriormente a la lámina se le agregó alcohol cetona durante 20 segundos. Luego se enjuagó con agua de grifo. Por último, se agregó Fucsina, se dejó por 1 minuto y finalmente se enjuagó con agua de grifo. Se secó la lámina sobre papel adsorbente y se observó al microscopio con aceite de inmersión mediante el objetivo de 100x (Madigan et al., 2010).

Se seleccionaron los aislamientos con morfología bacilo y cocos Gram positivos, catalasa y oxidasa negativa. Estos aislamientos fueron conservados a -80°C en caldo MRS

con glicerol al 40 %.

#### V.3.2.4.- Actividad antimicrobiana

Las BAL fueron seleccionados por su actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en pocillos en agar BHA (Balouiri et al., 2016; Chandrasekar et al., 2015). Las bacterias indicadoras fueron las cepas de las colecciones de cultivos tipo americana (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 43300, *L. monocytogenes* ATCC 7644 y *S. enteritidis* ATCC 13076) y española (*E. coli* CECT 47557, *S. enteritidis* CECT 915, *S. aureus* CECT 828, *L. monocytogenes* CECT 4032), y de la colección de cepas aisladas de queso Paipa (*L. monocytogenes* cepas L1, L4, L5, L6, L7, L8, *L. innocua* cepa L3, *S. aureus* cepas S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S10, S11, S15, S21, S22, S23, S26, S25, S20, *E. coli* cepas C10, C22, C8, C5, C3, *Escherichia fergusonii* strain C27, *Citrobacter freundii* cepas C2, C7, C11, C14, C18, C29, C33, *Citrobacter braakii* cepas C12, C19b, C30, *Proteus mirabilis* cepas C20, C19a, C34, C4, *Proteus vulgaris* cepa C3, *Proteus penneri* cepa C6, *Serratia marcescens* cepa C9 y C25c, *Hafnia alvei* cepa C24, *Hafnia paralvei* cepa C13, *Shigella dysenteriae* cepa 16, *Morganella morganii* cepa C17, *Acinetobacter baumannii* cepa C21, *Raoultella ornithinolytica* cepa C28).

Para ello, las BAL fueron cultivadas en caldo MRS a 30°C durante 24 h. Los cultivos se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Simultáneamente se cultivaron las cepas indicadoras en BHI a 37°C *overnight*. Luego se colocaron las torrecillas Oxford con pinzas estériles sobre agar cerebro corazón tamponado estéril (BHAT). El medio de cultivo BHAT se preparó mezclando los siguientes componentes (g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9,0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,085, agar-agar 16,15, caldo cerebro corazón 35,15 y 950 mL de agua destilada. Luego a 10 mL de BHAT fundido en autoclave y temperado a 55°C en baño termostatado (sobrecapa), se le agregó 60 µL de un cultivo *overnight* de la cepa indicadora patógena, se mezcló bien con el vórtex y se agregó a las cajas de Petri con agar BHAT que contienen las torrecillas. Se dejó solidificar y se quitaron las torrecillas con pinzas estériles. Posteriormente, en los pocillos formados se agregaron 100 µL del sobrenadante del cultivo de BAL obtenido previamente y se incubó a 37°C durante 16 h.

Luego se midieron el diámetro de los halos de inhibición en milímetros.

Como control positivo del experimento se utilizó el sobrenadante de un cultivo de *L. lactis* cepa ATCC 11454 productora de nisina. Como control negativo se utilizó caldo MRS estéril.

### V.3.3.- Caracterización de los aislamientos seleccionados

#### V.3.3.1.- Caracterización fenotípica

##### V.3.3.1.1.- Caracterización macroscópica

Las características macroscópicas de las colonias fueron determinadas por el crecimiento de las cepas en los agares MRS, KKA (Kanamicina, esculina, Azida), sangre, manitol, China Blue, SPC, Mossel, Baird Parker a 30°C durante las 48 h. Para la caracterización macroscópica se observaron características como el borde, la elevación, borde, aspecto, consistencia, color y en algunas el olor (Beltrán & Castellanos-Rozo, 2016).

##### V.3.3.1.2.- Caracterización microscópica

Se determinó su morfología y la formación de agrupaciones mediante el procedimiento de tinción de Gram (Ver V.3.2.3.- *Morfología y tinción de Gram*).

##### V.3.3.1.3.- Caracterización bioquímica

La caracterización bioquímica se llevó a cabo utilizando el sistema de identificación bioquímica BBL™ Crystal™ Identification Systems Gram-positive ID Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante (Becton Dickinson, Maryland, EE.UU.). Las bacterias seleccionadas (cocos o bacilos Gram positivos, oxidasa y catalasa negativa), fueron cultivadas por agotamiento en agar MRS a 30°C durante 24 h. Luego se tomó una

colonia pura y se suspendió completamente en un tubo de fluido de inóculo BBL Crystal GP. Posteriormente, se ajustó la turbidez del cultivo teniendo como referencia un patrón McFarland N° 0,5. Luego se agregó todo el contenido del tubo de fluido de inóculo en el área demarcada de la base del microsistema. Se tomó la base con las dos manos y se balanceó suavemente hasta que todos los pocillos se llenaron con el inóculo. Luego se balanceó nuevamente la base para escurrir el exceso de líquido de vuelta a la base demarcada y se puso sobre la mesa. Se alineó la tapa y se presionó hacia abajo con los pulgares puestos a cada lado para cerrarla. Luego los paneles se colocaron boca abajo en una estufa a 30°C durante 24 h (BBL™ Crystal™ Identification, 2020). Luego del periodo de incubación los paneles fueron leídos usando la tabla 3 del inserto [https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8809711JAA\(02\).pdf](https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8809711JAA(02).pdf) (BBL™ Crystal™ Identification, 2020). Los resultados fueron anotados en un block de informes BBL Crystal GP y luego se calculó el número de perfil BBL cristal (BBL™ Crystal™ Identification, 2020). Para obtener la identificación, el número del perfil resultante y la morfología celular fueron incluidos en un computador al cual previamente se le instaló el software BBL Crystal MIND.

#### V.3.3.1.4.- Pruebas de resistencia

##### V.3.3.1.4.1.- Efecto de la concentración de NaCl sobre las cepas seleccionadas

Las cepas fueron repicadas por duplicado en agar MRS preparado a diferentes concentraciones: 0,85, 1, 4, 6,5%. Las placas fueron incubadas a 30°C por 72 h. Luego se determinó presencia o ausencia de colonias.

##### V.3.3.1.4.2.- Efecto de la temperatura sobre las cepas seleccionadas

Las cepas fueron repicadas por duplicado en agar MRS. Las cajas fueron incubadas a diferentes temperaturas (4, 15, 30, 37 42 y 45°C) durante 72 h. Luego se determinó presencia o ausencia de crecimiento.

#### V.3.3.1.4.3.- Efecto del pH sobre las cepas seleccionadas

Las cepas fueron repicadas por duplicado en tubos con caldo MRS preparado a diferentes valores de pH (2, 4, 6,5, 9, 12). Los tubos fueron incubados a 30°C por 72 h. Luego se determinó presencia o ausencia de turbidez.

#### V.3.3.1.4.4.- Susceptibilidad a los antimicrobianos

Las cepas de BAL seleccionadas por su actividad antimicrobiana fueron evaluadas por su susceptibilidad a los antibióticos mediante el método de difusión en disco (CLSI, 2019). Los antibióticos utilizados fueron Ampicilina (10 µg), Cloranfenicol (30 µg), Penicilina (10 µg), Eritromicina (15 µg), Kanamicina (30 µg), Tetraciclina (30 µg), Vancomicina (30 µg), Rifampicina (5 µg), Carbenicilina (100 µg), Oxacilina (1 µg), Estreptomina (10 µg), Clindamicina (10 µg), Levofloxacina (30 µg), Trimetropin-sulfa (25 µg). Todos los sensi-discos utilizados fueron marca Oxoid (Basingstoke, Reino Unido).

#### V.3.3.2.- Identificación molecular

La identificación de los aislados bacterianos se llevó a cabo mediante la amplificación y el análisis de la secuencia de ADNr 16s. Las cepas se cultivaron en agar MRS a 30°C durante 24 h. La extracción de ADN, amplificación por PCR y análisis de las secuencias se realizaron según se describe en el apartado V.2.2.- Identificación de los aislamientos por secuenciación del gen ARNr 16S. El análisis filogenético se llevó a cabo utilizando el software MEGA MX versión 10.0.4, utilizando el modelo de dos parámetros de Kimura y construyendo el árbol de distancia por el método Neighbor-Joining con 1.000 iteraciones.

### **V.4.- Purificación y caracterización de las sustancias antibacterianas producidas por las bacterias ácido lácticas seleccionadas**

#### V.4.1.- Curva de crecimiento de las bacterias ácido lácticas productoras de sustancias antibacterianas

Se realizó una siembra de la cepa conservada a -80°C en BHI con glicerol al 40 % en placas con agar MRS. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 h. Luego de obtener el cultivo puro se repicó una colonia en 2 mL de caldo MRS y se incubó a 30°C durante 16 h.

Posteriormente se inoculó caldo MRS (150 mL) al 2% con la cepa que presentó actividad antimicrobiana, se agitó bien y se dispensó de a 10 mL en 16 tubos falcon estériles. Posteriormente se incubaron a 30°C durante 48 h. Se tomó un tubo de la estufa durante los siguientes tiempos (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30, 36, 42 y 48 h). Cada tubo se homogenizó y se le realizó diluciones seriadas en base 10 y recuento en placa de células viables por duplicado en agar MRS. También de cada tubo se tomó 1 mL y se midió la densidad óptica a 600 nm.

Posteriormente se midió el pH del medio de cultivo y se ajustó a 6,5 con NaOH 10N. Luego de ajustar el pH, se dispensó el caldo MRS en tubos eppendorff (1mL por tubo), y los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se recuperaron todos los sobrenadantes en una placa de Petri estéril. Se tomaron con una jeringa estéril y luego se filtraron por filtros de 0,22 µm (Millipore, EU). Luego se recuperaron en un tubo falcon estéril. Posteriormente se realizó la prueba de difusión en agar (prueba de pocillos descrita anteriormente). Como bacteria indicadora se utilizó *L. monocytogenes* ATCC 7466.

#### V.4.2.- Purificación parcial de las sustancias antibacterianas por cromatografía de intercambio catiónico

Se realizó una siembra de la cepa con actividad antimicrobiana conservada a -80°C en BHI con glicerol al 40 % en placas con agar MRS. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 h. Luego de obtener el cultivo puro se repicó una colonia en 2 mL de caldo

MRS y se incubó a 30°C durante 16 h. Posteriormente se inoculó la cepa al 2 % en caldo MRS (150 mL) y se incubó durante 16 h a 30°C. Luego se realizó una inoculación al 2 % de la cepa en 1 L de caldo MRS y se incubó de la misma manera.

Finalmente se realizó una inoculación al 2% con un volumen final de 10 L de caldo MRS. Se incubó a 30°C durante el tiempo donde se encontró la mayor actividad antimicrobiana según la curva de crecimiento para cada bacteria (16 y 24 h respectivamente).

Posterior a la incubación, se ajustó el pH del cultivo a 6,5 con NaOH 10 N. Luego se le agregó al cultivo la matriz de intercambio iónico CM Sephadex C-25 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden), se mezcló bien y se prosiguió a incubar a 37°C con agitación de 150 rpm, durante 45 minutos. Posteriormente se dejó decantar el cultivo durante 30 minutos. Luego el sobrenadante fue descartado en el lavado lentamente e inactivado simultáneamente con hipoclorito de sodio al 5,25 %. A medida que se fue descartando el sobrenadante, se recolectó una muestra de 10 mL.

El gel se trasladó a la columna y se lavó con 250 mL de agua Milli Q y se tomó dos fracciones de los lavados cada uno de 10 mL. Luego se prosiguió a eluir con NaCl 0,5 M y se tomaron dos fracciones de 10 mL del eluido. Posteriormente se realizó una segunda elución con NaCl a 1,5 M. Simultáneamente se tomaron 18 fracciones de 10 mL durante el transcurso de la elución. La actividad antimicrobiana de las fracciones recolectadas fue evaluada mediante el método de difusión en agar descrito anteriormente (*ver sección V.3.3.-*). Se usó como bacteria indicadora *L. monocytogenes* ATCC 7466.

#### V.4.3.- Caracterización de las sustancias antibacterianas

##### V.4.3.1.- Efecto de la temperatura sobre las sustancias antibacterianas

El efecto de la temperatura sobre las sustancias antibacterianas se evaluó calentando 1 mL del eluido cromatográfico a 30, 60, 80 y 100°C durante 120 minutos.

También se tomó 1 mL del eluido y se sometió al proceso de autoclavado (121°C durante 15 minutos a 15 libras de presión). La actividad antimicrobiana de los compuestos se midió mediante el método de difusión de pocillos de agar por triplicado. *L. monocytogenes* ATCC 7644 se utilizó como cepa indicadora (Chandrasekar et al., 2015).

#### V.4.3.2.- Efecto del pH sobre las sustancias antibacterianas

En un experimento paralelo, se ajustó el pH del eluido (1mL) a 2,0, 6,5, 9,0 y 12 con HCl 1 N y NaOH 1 N. Luego los eluidos con el pH ajustado, fueron incubados a 30°C durante 2 h. Después de este período, el pH de las muestras se reajustó al pH 6,5. Luego se midió la actividad antimicrobiana de los compuestos mediante el método de difusión de pocillos de agar por triplicado. *L. monocytogenes* ATCC 7644 se utilizó como cepa indicadora.

#### V.4.3.3.- Efecto de las enzimas proteolíticas sobre las sustancias antibacterianas

A tres tubos eppendoff se les agregó 400 µL del eluido cromatográfico. A un tubo se le agregó 20 µL de pepsina de estómago de porcino (Fluka, Alemania) a una concentración final de 10 mg/mL, a otro tubo se le agregó 20 µL de proteinasa K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a una concentración final de 10 mg/mL, y al otro tubo 20 µL de tripsina de páncreas porcino a una concentración final de 10 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Luego los tubos fueron incubados a 37°C durante 12 h. Pasado el tiempo de incubación se midió la actividad antimicrobiana de los compuestos mediante el método de difusión en pocillos por triplicado (Sección 3.3). *L. monocytogenes* ATCC 7644 se utilizó como cepa indicadora.

#### V.4.3.4.- Efecto de los compuestos químicos sobre las sustancias antibacterianas

Se tomaron 5 tubos eppendorff. A cada tubo se les agregó 400 µL del eluido conteniendo actividad antibacteriana. Al primer tubo se le agregó EDTA a una concentración final del 1 %, al segundo tubo Tween 20 al 1 %, al tercer tubo Tween 80 al

1 %, al cuarto tubo SDS al 1 % y al quinto tubo se le agregó urea a 1M. Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Las muestras se incubaron a 30°C durante 24 h. Posteriormente la actividad antibacteriana de los eluidos se evaluó mediante el método de difusión en pocillos por triplicado. *L. monocytogenes* ATCC 7644 se utilizó como cepa indicadora. La actividad antimicrobiana se evaluó por medición del tamaño del diámetro de los halos de inhibición en milímetros.

#### V.4.3.5.- Espectro de actividad de las sustancias antimicrobianas parcialmente purificadas

El espectro de la actividad antimicrobiana de los eluido cromatográficos fue evaluado mediante el método de difusión en pocillos en agar BHA como se describió anteriormente (*ver sección V.3.3.-*). Se utilizaron como cepas indicadoras las cepas Gram positivas: *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* CECT 828, *S. aureus* cepas S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S10, S11, S15, S21, S22, S23, S26, S25, S20, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 49907, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* CECT 4032 *L. monocytogenes* cepas L1, L4, L5, L6, L7, L8, *L. innocua* cepa L3, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus faecium* ATCC 33667, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. thuringiensis* ATCC 33679, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactococcus acidophilus* ATCC 4356, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386 y *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *L. lactis* ATCC 11454, *L. lactis* QP63 y *L. mesenteroides* QP117. En el caso de *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactococcus acidophilus* ATCC 4356, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386, los ensayos se realizaron mediante incubación en jarras de anaerobiosis de 2,5 L con sobres del CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific™, USA) a una temperatura de 30°C durante 48h. En el caso de *Clostridium perfringens*, los ensayos se realizaron mediante incubación en jarras de anaerobiosis de 2,5 L y sobres de AnaeroGen™ a una temperatura de 35°C durante 24 h (Thermo Scientific™, USA).

Como cepas indicadoras Gram negativas se utilizaron: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* CECT 47557, *E. coli* cepas C10, C22, C8, C5, C3, *Escherichia fergusonii* cepa C27, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *S. enteritidis* CECT 915, *Citrobacter freundii* cepas

C2, C7, C11, C14, C18, C29, C33, *Citrobacter braakii* cepas C12, C19b y C30, *Proteus mirabilis* cepas C20, C19a, C34, C4, *Proteus vulgaris* cepa C3, *Proteus penneri* cepa C6, *Serratia marcescens* cepas C9 y C25c, *Hafnia alvei* cepa C24, *Hafnia paralvei* cepa C13, *Shigella dysenteriae* cepa 16, *Morganella morganii* cepa C17, *Acinetobacter baumannii* cepa C21, *Raoultella ornithinolytica* cepa C28. Como control positivo se utilizó nisina grado analítico (Sigma-Aldrich, 98% de pureza) a concentraciones de 6 y 12 mg/L en ácido clorhídrico 0,02 N. Como control negativo se utilizó caldo MRS estéril.

#### V.4.3.6.- Determinación del peso molecular de las sustancias antibacterianas por MALDI-TOF MS)

Se tomó 1  $\mu$ L del eluido cromatográfico que presentó mayor actividad antimicrobiana (E4 para *L. mesenteroides* QP117 y E6 para *L. lactis* QP63) y se depositó sobre un pocillo de la placa del MALDI, después se agregó 1 $\mu$ L de la matrix orgánica (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico). Se utilizó como control positivo una solución de nisina de grado comercial (Sigma Aldrich 99% de pureza) al 1% diluida en una solución de NaCl al 0,85% estéril. Tanto las muestras como el control se realizaron por duplicado. Las muestras se dejaron secar durante 20 minutos, luego las placas fueron colocadas en el equipo. El análisis de identificación MALDI-TOF MS se llevó a cabo utilizando un instrumento Autoflex (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA) operado en el modo iónico positivo lineal utilizando el software FlexControl 3.1. Los espectros se analizaron en un rango de masa molecular de 2-10 kDa y los picos se examinaron comparándolos con los descritos en la base de datos <http://bactibase.hammamilab.org/search.php>.

## **VI.- RESULTADOS**

## VI.1.- Análisis de la diversidad bacteriana del queso Paipa por secuenciación masiva

### VI.1.1.- Características de las lecturas de las muestras secuenciadas

Se obtuvieron un total de 4,922,740 lecturas de las 24 muestras de queso. Después del control de calidad, se obtuvieron 3,786,938 lecturas fusionadas, de las cuales 3,486,293 eran lecturas no quiméricas. El número total de lecturas asignadas a unidades taxonómicas operativas (UTOs) por muestra osciló entre 100,681 y 189,360 (Tabla 6).

**Tabla 6.** Número de lecturas e índices de diversidad alfa a nivel de género de las muestras de queso Paipa

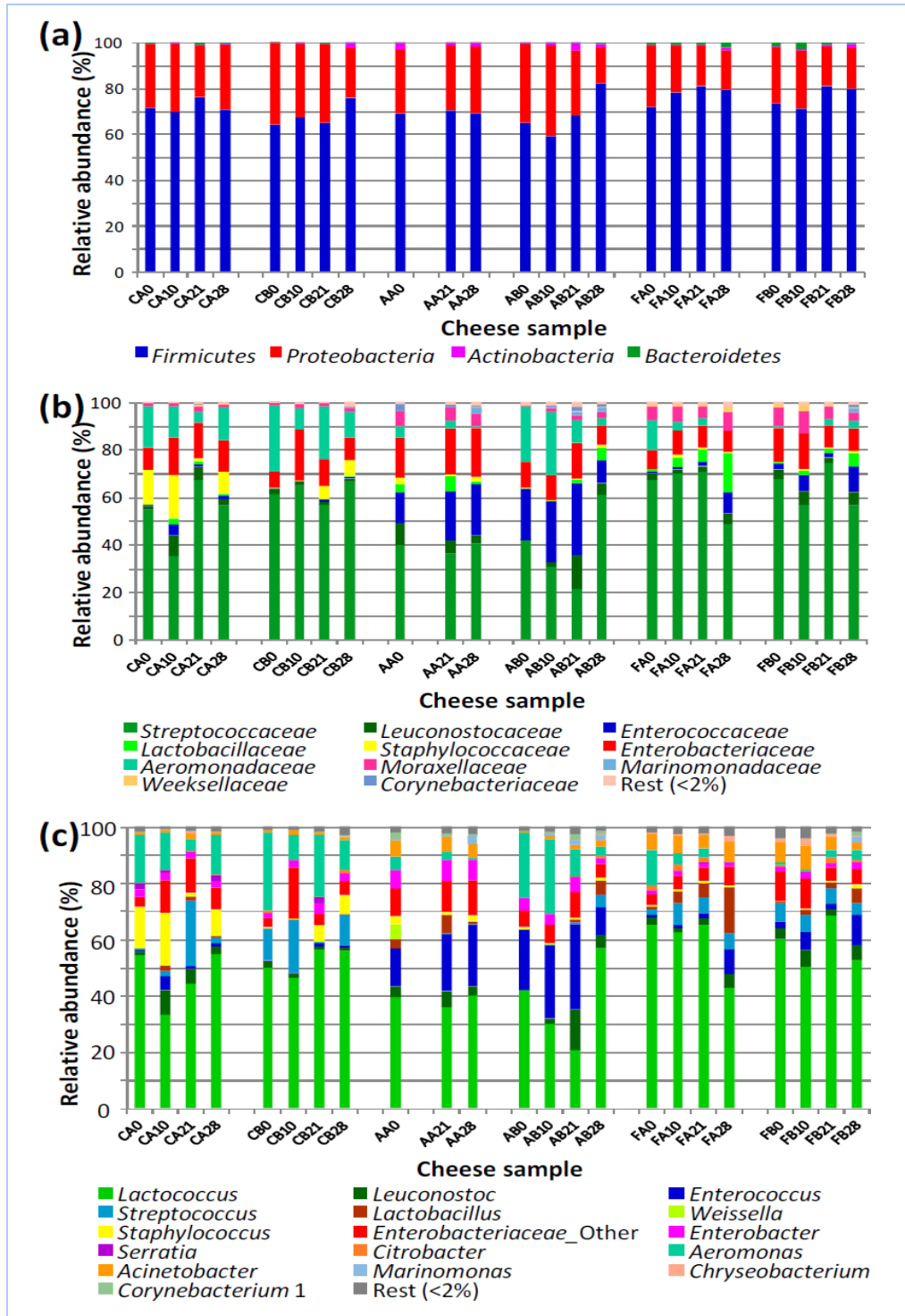
Muestra	N° lecturas	N° Observaciones	Chao1	ACE	Shannon	Simpson
CA0	119123,00	32,00	32,00	32,00	1,50	0,65
CA10	117789,00	28,00	28,00	28,00	1,98	0,81
CA21	100681,00	33,00	33,00	33,00	1,73	0,73
CA28	106138,00	32,00	32,00	32,00	1,64	0,66
CB0	101205,00	25,00	25,00	25,00	1,41	0,66
CB10	105216,00	27,00	27,00	27,00	1,55	0,71
CB21	112479,00	32,00	32,00	32,00	1,45	0,62
CB28	104831,00	31,00	31,00	31,00	1,65	0,66
AA0	124879,00	33,00	33,00	34,08	2,10	0,80
AA10	6744,00	13,00	13,00	13,00	1,71	0,67
AA21	130445,00	30,00	30,00	30,00	1,99	0,80
AA28	125251,00	35,00	35,00	35,00	1,89	0,77
AB0	189360,00	26,00	26,00	26,00	1,52	0,72
AB10	153619,00	31,00	31,00	31,35	1,74	0,77
AB21	158773,00	34,00	34,00	34,44	2,05	0,82
AB28	157004,00	41,00	41,00	41,00	1,74	0,66
FA0	161174,00	41,00	41,00	41,00	1,40	0,55
FA10	128947,00	37,00	37,00	37,00	1,57	0,59
FA21	151273,00	39,00	39,00	39,00	1,50	0,56
FA28	151121,00	45,00	45,00	45,00	1,91	0,76
FB0	152092,00	44,00	44,00	44,00	1,59	0,61
FB10	162325,00	51,00	51,00	51,00	1,86	0,71
FB21	177231,00	45,00	45,00	45,00	1,41	0,52
FB28	160890,00	44,00	44,00	44,00	1,86	0,70

La muestra AA10 (muestra A del productor A en el día 10 de maduración) fue una excepción, ya que contenía un número muy bajo de lecturas. Además, después de la

asignación de UTOs, la muestra 10 no mostró la composición microbiana típica de los quesos, sino que contenía una abundancia relativa muy alta de *Pseudomonas*. Por lo tanto, esta muestra no se incluyó en el análisis después de este punto. Los índices de diversidad alfa se muestran en el Tabla 6.

#### VI.1.2.- Poblaciones bacterianas en las muestras de quesos

El principal filo bacteriano encontrado en los quesos fue *Firmicutes*, con abundancias relativas que van desde el 59,2 % hasta el 82 % (Figura 5a). El segundo filo principal fue *Proteobacteria*, con abundancias relativas que oscilan entre el 15,93 % y el 39,50 %. *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* tenían abundancias relativas mucho más bajas, siempre por debajo del 3,5 %. El grupo de *Firmicutes* estaba representado principalmente por miembros del Orden *Lactobacillales*. Las UTOs con mayor abundancia relativa en la mayoría de las muestras de queso (del 21,45 % al 74,40 %) pertenecían a la Familia *Streptococcaceae* (Figura 5b). El género principal detectado en este grupo fue *Lactococcus* (Figura 5c), que se detectó en todas las muestras de queso (en abundancias relativas que oscilan entre 20,96 % y 68,64 %). El segundo grupo en abundancia relativa fue la Familia *Enterococcaceae*, con el género *Enterococcus* como principal representante. El género *Enterococcus* fue el más frecuente en los quesos del productor A en comparación con los otros quesos, alcanzando hasta 30,38 % en una muestra. *Leuconostoc* y *Streptococcus* también se encontraron en muchas otras muestras de queso, aunque tenían abundancias relativas muchos menores. El género *Staphylococcus* fue detectado en abundancias relativas de  $\geq 2$  % en 6 muestras (todas ellas pertenecientes a quesos de los productores C y A), alcanzando el 18,63 % en una muestra.

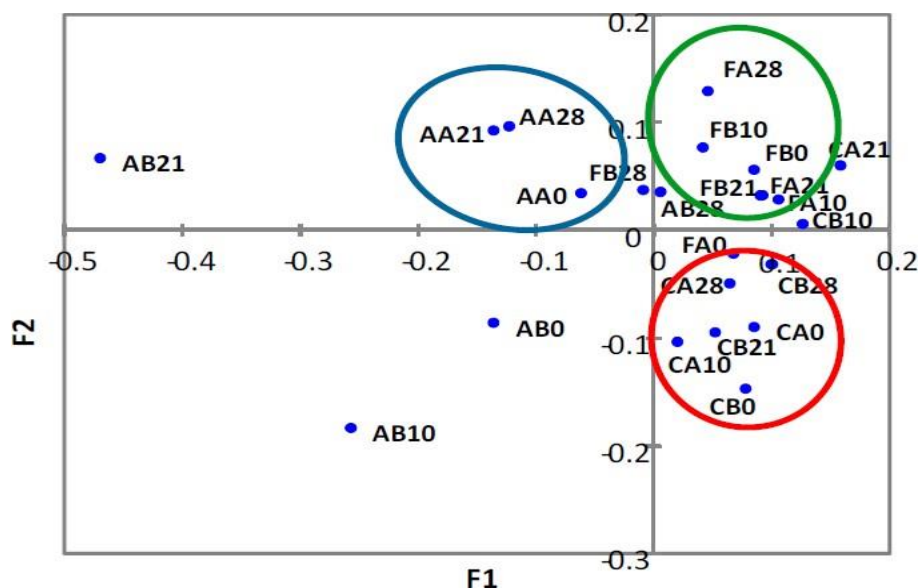


**Figura 5.** Diversidad bacteriana de muestras de queso Paipa a niveles de phylum (a), familia (b) y género (c). Se analizaron muestras de queso de tres productores formales (C, A, F) correspondientes a dos lotes independientes (A y B) en diferentes tiempos de maduración (0, 10, 21, 28 días)

Las proteobacterias fueron representadas principalmente por Gammaproteobacterias pertenecientes a la Familia *Enterobacteriaceae* y *Aeromonadaceae* y, en menor medida, también *Moraxellaceae* (Figura 5b). *Enterobacteriaceae* se detectó en todas las muestras de queso, con abundancias relativas compuestas entre 3,36 % y 12,30 %. Las UTOs asignadas al género *Enterobacter* también fueron detectadas en todas las muestras de queso, aunque tenían menores abundancias relativas (Figura 5c). *Serratia* se detectó en abundancias relativas entre el 2 % y el 3 % en tres de las muestras de queso C. *Citrobacter* también fue relevante, especialmente en muestras del productor F (llegando al 2,30 % en una muestra).

Dentro de Familia *Aeromonadaceae*, la presencia de UTOs asignadas al género *Aeromonas* fue relevante en la mayoría de las muestras de queso, alcanzando altas abundancias relativas en algunos casos (hasta 27,60 %). *Acinetobacter* (Fam. *Moraxellaceae*) también se detectó con frecuencia en abundancias relativas de hasta 8,60 %, principalmente en las muestras de queso FA y AB. Otros géneros (*Marinomonas*, *Corynebacterium* y *Chryseobacterium*) sólo se detectaron en abundancias relativas del  $\geq 2$  % en algunas muestras de queso. Durante la maduración no se observaron cambios importantes en las poblaciones bacterianas. La abundancia relativa de *Lactococcus* sólo aumentó ligeramente pero no significativamente ( $p > 0,05$ ) al final de la maduración en las muestras de queso CA (día 21), CB (días 21 y 28) y FB (día 21), pero en algunos casos disminuyó (AB21, FA28).

El análisis de componentes principales (ACP) reveló que la mayoría de las muestras de queso se agruparon según el origen de la muestra (productor local) e independientemente del lote de producción (Figura 6). Sin embargo, también había valores atípicos claros, especialmente en las muestras del productor de queso A. Una característica distintiva de los quesos del productor A fue la mayor abundancia relativa de UTOs asignadas al género *Enterococcus*.



**Figura 6.** Análisis de componentes principales del microbioma bacteriano del queso Paipa. Se analizaron muestras de queso de tres productores formales (C, A, F) correspondientes a dos lotes independientes (A y B) en diferentes tiempos de maduración (0, 10, 21, 28 días). Las elipses indican la agrupación de las muestras de los productores C (rojo), A (azul) y F (verde)

## VI.2.- Evaluación de la calidad microbiológica del queso Paipa comercializado por empresas formales e informales

### VI.2.1.- Recuento y aislamiento de las poblaciones bacterianas

Las muestras de queso de microempresas formales e informales mostraron recuentos similares de aerobios mesófilos (entre siete y nueve unidades logarítmicas por gramo de queso), mientras que las poblaciones de mohos y levaduras se encontraban entre cuatro y ocho unidades logarítmicas/g (Tabla 7). Todas las muestras obtenidas de microempresas formales e informales presentaron recuentos de estafilococos y coliformes por encima de la Norma Técnica Colombiana 750. *L. monocytogenes* estuvo presente en el 37,5 % de las muestras (3 formales y 3 microempresas informales). *Salmonella* sp. no se detectó en ninguna de las muestras (Tabla 7).

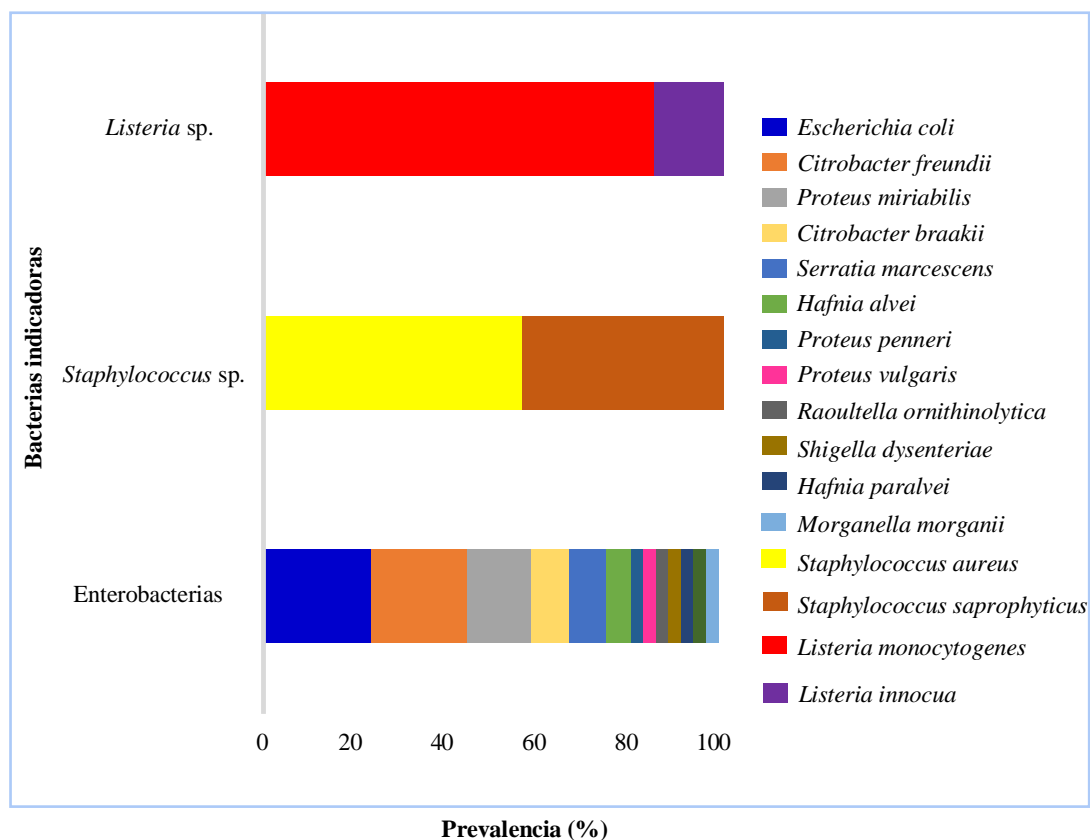
**Tabla 7.** Análisis microbiológico de quesos Paipa comercializados por microempresas formales e informales

Grupo Indicador	EMPRESAS FORMALES								EMPRESAS INFORMALES								L.P*
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	
A. mesófilos (Log UFC/g)	8,57±0,9	8,13±0,9	9,48±1,0	8,87±0,3	8,26±0,4	8,26±0,5	8,04±0,4	8,09±0,0	8,06±0,1	8,51±0,0	7,52±0,0	8,26±0,6	7,49±0,3	8,73±0,3	7,98±0,0	8,34±0,0	N/A
Hongos (Log UFC/g)	6,24±0,3	4,15±0,0	6,48±0,3	6,33±1,6	6,25±0,4	8,00±1,4	6,00±0,5	7,61±0,7	6,74±0,2	8,43±0,5	7,28±0,6	7,65±1,6	8,11±0,9	7,26±0,6	8,78±0,0	6,67±0,0	N/A
<i>Staphylococcus</i> sp. (Log UFC/g)	6,40±0,0	5,14±0,3	6,08±1,5	5,25±0,3	4,87±0,2	4,80±0,3	5,62±0,0	6,89±0,5	4,83±1,3	5,66±0,0	5,75±1,4	5,59±1,9	7,13±0,3	4,00±0,2	4,20±0,0	3,10±0,0	3
Coliformes totales (Log NMP/g)	8,04±0,0	5,55±1,2	6,09±1,0	6,50±0,7	6,30±0,0	3,40±0,6	4,37±0,0	5,04±0,1	4,35±1,0	5,04±0,0	4,35±1,0	4,85±0,3	5,04±0,0	5,04±0,0	5,04±0,0	6,56±0,0	3
Coliformes fecales (Log NMP/g)	5,21±3,7	3,70±0,3	5,09±2,2	5,15±0,7	6,15±0,0	2,93±0,1	2,20±1,2	4,76±0,4	3,84±1,7	3,84±1,7	3,85±1,7	4,71±0,5	4,85±0,3	5,04±0,0	4,04±0,0	6,36±0,0	2
<i>Salmonella</i> sp. (P/A)/25 g	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>L.</i> <i>monocytogenes</i> (P/A)/ 25 g	P	A	A	A	A	A	P	P	A	A	A	A	A	P	P	P	A

P, presencia. A, ausencia. \*L. P, límite permisible según la Norma Técnica Colombiana 750 (ICONTEC, 2009)

## VI.2.2.- Identificación de los aislamientos potencialmente patógenos por secuenciación del gen ARNr 16S

Los resultados obtenidos por secuenciación del gen ARNr 16S indicaron que el 56 % de las especies de *Staphylococcus* sp., aisladas en agar salado manitol (n=31) fueron *S. aureus* y 44 % fueron *Staphylococcus saprophyticus*. Los resultados también indicaron que el 22,2 % de las enterobacterias aisladas (n=36) fueron *Escherichia coli*, 22,2 % fueron *Citrobacter freundii*, 13,9 % *Proteus mirabilis*, 8,33 % *Citrobacter braakii*, 8,33 % *Serratia marcescens*, 5,5 % *Hafnia alvei*, 2,7 % *Proteus penneri*, 2,7 % *Proteus vulgaris*, 2,7 % *Raoultella ornithinolytica*, 2,7 % *Shigella dysenteriae*, 2,7 % *Hafnia paralvei*, y 2,7 % *Morganella morganii*. También se obtuvieron aislamientos de *Acinetobacter baumannii* correspondiente al 2,7 %. Los resultados también indicaron que el 85 % de las listerias aisladas (n=6) fueron *L. monocytogenes* y el 15 % fueron *Listeria innocua* (Figura 7).



**Figura 7.** Prevalencia de bacterias patógenas aisladas en el queso Paipa

### VI.2.3.- Susceptibilidad a los antimicrobianos

Los resultados indicaron que la mayoría de las cepas de *S. aureus* fueron susceptibles a los antibióticos ensayados. Todos los aislamientos fueron sensibles a la cefoxitina (antibiótico usado como sustituto para combatir cepas oxacilina/meticilina resistentes). Sin embargo, el 7 % fueron resistentes a la tetraciclina y la eritromicina, pero ninguna de las cepas mostró multiresistencia a los antibióticos (Tabla 8).

**Tabla 8.** Perfil de sensibilidad de los aislamientos de *S. aureus* a los antibióticos

Antibióticos	S	I	R	Cepas sensibles (%)
Cloranfenicol (C 30 µg)	≥ 18	13–17	≤ 12	100
Penicilina (P 10 µg)	≥ 29	–	≤ 28	100
Tetraciclina (TE 30 µg)	≥ 19	15–18	≤ 14	93
Clindamicina (DA 10 µg)	≥ 21	15–20	≥ 14	100
Levofloxacin (LEV 5 µg)	≥ 19	16–18	≤ 15	100
Trimetropin Sulfa (SXT 25 µg)	≥ 16	11–15	≤ 10	100
Cefoxitina (FOX 30 µg)	≥ 22	–	≤ 21	100
Ciprofloxacina (CIP 5 µg)	≥ 21	16–20	≤ 15	100
Eritromicina (E 15 µg)	≥ 23	14–22	≤ 13	93

S: sensible; I: intermedio; R: resistente.

Por otro lado, el 100 % de las cepas de *L. monocytogenes* fueron sensibles a todos los antibióticos probados. Del mismo modo, el 94,1 % de las cepas coliformes fueron sensibles a cloranfenicol, ertapenem y levofloxacino, el 85 % fueron sensibles a trimetropin-sulfa, ciprofloxacina y gentamicina, el 76,5 % a tetraciclina y a ampicilina, mientras que el 67% de las cepas fueron sensibles a cefoxitina (Tabla 9).

**Tabla 9.** Perfil de sensibilidad de los coliformes a los antibióticos

Antibiótico	S	I	R	Cepas sensibles (%)
Tetraciclina (TE 30 µg)	≥15	12-14	≤11	76,5
Amikacina (AK 30 µg)	≥17	15-16	≤14	79,4
Chloranfenicol (C 30 µg)	≥18	13-17	≤12	94,1
Trimethopin Sulfa (SXT 25 µg)	≥16	11-15	≤10	85,3
Ampicilina (AMP 10 µg)	≥ 17	14-16	≤ 13	76,5
Ertapenem (ETP 10 µg)	≥ 22	19-21	≤ 18	94,1
Imipenem (IPM 10 µg)	≥ 23	20-22	≤ 19	91,2
Cefoxitin (FOX 30 µg)	≥ 18	15-17	≤ 14	67,6
Ceftaxidime (CAZ 30 µg)	≥ 21	18-20	≤ 17	97,0
Ceftriazona (CRO 30 µg)	≥ 23	20-22	≤ 19	91,2
Ciprofloxacina (CIP 5 µg)	≥ 26	22-25	≤ 21	85,3
Levofloxacina (LEV 5 µg)	≥ 21	17-20	≤ 16	94,1
Gentamicina (CN 10 µg)	≥ 15	13-14	≤12	85,3
Ácido nalidíxico (NA 30 µg)	≥ 19	14-18	≤ 13	88,2

S: sensible; I: intermedio; R: resistente.

#### VI.2.4.- Tolerancia a los biocidas por las cepas multi-resistentes a los antibióticos Los

resultados demuestran que el 30 % de las cepas de coliformes fueron resistentes a los antibióticos. *P. mirabilis* cepa CFQP121b y *E. coli* cepa CFA11 fueron resistentes a siete antibióticos, *C. freundii* cepa CFC25 fue resistente a cinco antibióticos y *C. freundii* cepa cfc2A Rappaport y *C. freundii* cepa CFA22 fueron resistentes a tres antibióticos. Sin embargo, estas cepas no fueron resistentes a los biocidas. Las excepciones fueron *S. marcescens* cepa CFC11, *C. freundii* cepa CFA14 y *C. freundii* cepa cfc2A Rappaport, las cuales resistieron una concentración de 8 mg/L de triclosan (Tabla 10).

**Tabla 10.** Cepas multirresistentes y su tolerancia a los biocidas

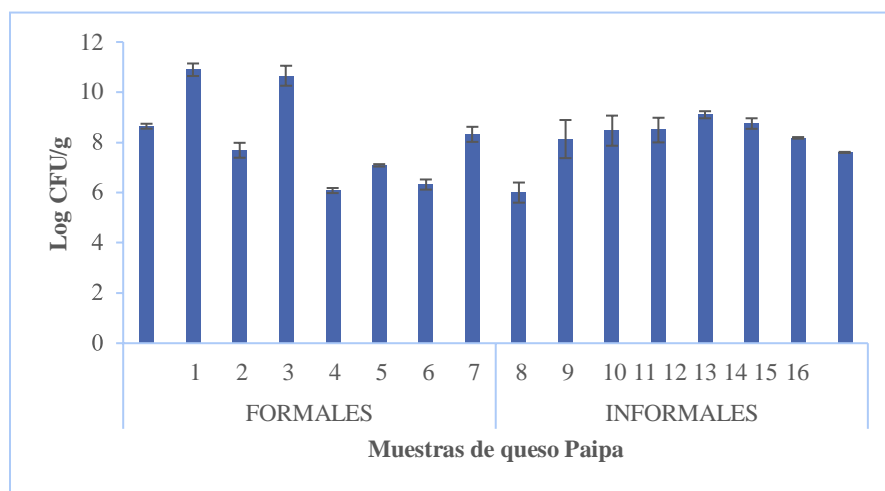
Aislamientos	Antibióticos	Concentración mínima inhibitoria del biocida CMI (mg/L)					
		C	CL	BC	HC	HP	T
<i>Citrobacter freundii</i> CFC25	TE, AMP, FOX, IPM, NA	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>Citrobacter freundii</i> cfc2A Rappaport	C, FOX, CRO	<2	<2	<2	<2	<2	8
<i>Citrobacter freundii</i> CFA22	SXT, AMP, FOX	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>Citrobacter freundii</i> CFA14	FOX, CIP	<2	<2	<2	<2	<2	8
<i>Citrobacter freundii</i> CFC52	TE, FOX	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>E. coli</i> CFA11	TE, SXT, CIP, C, AMP, NA, CN	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>E. coli</i> CFA15	AK, IPM, CN	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>E. coli</i> CFS21	LEV, CN	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>Morganella morganii</i> CFA3	TE, AMP, CN, FOX	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>Proteus mirabilis</i> CFQP121	TM/SXT, ETP, FOX, CRO, IPM, CAZ, NA	<2	<2	<2	<2	<2	<2
<i>Serratia marcescens</i> CFC11	AMP, CN, AK, FOX	<2	<2	<2	<2	<2	8

AMP, ampicilina; CTX, cefotaxime; CFZ, ceftazidime; IMP, imipenem; SM, estreptomicina; CIP, ciprofloxacina; CM, cloranfenicol; TET, tetraciclina; NAL, ácido nalidixico; NET, netilmicina; TM/STX, trimethoprim-sulfametoxazol; FOX, Cefoxitina; C, Cetrimida; CL, clorhexidina digluconato; BC, Cloruro de benzalconio; HC, hexaclorofeno; HP, Cloruro de cetilpiridinio; T, triclosan.

### VI.3.- Selección y caracterización de bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana

#### VI.3.1.- Recuento de bacterias ácido lácticas

Se determinaron los recuentos de bacterias del ácido láctico (BAL) presentes en diferentes muestras de queso Paipa. Los recuentos variaron entre 6 y 10,89 Log UFC/g (Figura 8).



**Figura 8.** Recuento de BAL en muestras de queso Paipa

### VI.3.2.- Selección de las bacterias ácido lácticas productoras de sustancias antibacterianas

Se aislaron un total de 250 morfotipos en agar MRS, de los cuales 208 (equivalentes al 86 %) mostraron características típicas de BAL, bacilos o cocos Gram-positivos, catalasa y oxidasa negativos. El 14 % de los aislados presentaron características típicas de levaduras, colonias mucosas cremosas u opacas, oxidasa negativa, catalasa positiva (Figura 9).



**Figura 9.** Bacterias ácido lácticas productoras de sustancias antimicrobianas

Sólo dos cepas (QP117 y QP63) de 208 evaluadas mostraron actividad antagónica. La cepa QP117 se aisló de muestras de queso Paipa de una empresa formal, mientras que la cepa QP63 fue aislada de una empresa informal. Ambas cepas (QP117 y QP63), presentaron actividad antimicrobiana contra las listerias evaluadas en este estudio (*L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* CECT 4032 y contra las cepas de *L. monocytogenes* aisladas del queso Paipa. Los resultados demuestran que la actividad de estas cepas es muy similar a la presentada por la cepa referencia *L. lactis* ATCC 11454 contra las *L. monocytogenes* evaluadas en este estudio independiente de su origen. Por otro lado, los resultados también indicaron que la cepa QP63 y *L. lactis* ATCC 11454 inhibieron todas las cepas *S. aureus*

coagulasa positiva. Por el contrario, la cepa QP117 no tuvo actividad frente a *S. aureus* (Tabla 11).

**Tabla 11.** Inhibición de *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* por las BAL seleccionadas

Cepa indicadora	Cepa QP63*	Cepa QP117*	<i>L. Lactis</i> ATCC 11454*	Origen
<i>L. monocytogenes</i> ATTC 7644	16,0±0,7	21,5±0,7	16,5±0,7	E. Unidos
<i>L. monocytogenes</i> CECT 4032	12,0±0,0	20,0±0,0	19,0±0,0	España
<i>L. monocytogenes</i> L1	17,0±0,0	17,0±0,0	16,5±0,7	Colombia
<i>L. monocytogenes</i> L4	17,0±0,0	18,0±0,0	19,5±0,7	Colombia
<i>L. monocytogenes</i> L5	19,0±0,0	18,5±0,7	17,5±0,7	Colombia
<i>L. monocytogenes</i> L6	17,0±0,0	17,0±0,0	20,0±0,0	Colombia
<i>L. monocytogenes</i> L7	17,0±0,0	18,3±0,6	17,0±1,41	Colombia
<i>L. monocytogenes</i> L8	17,0±0,0	17,5±0,7	20,0±0,0	Colombia
<i>L. innocua</i> L3	18,0±0,0	21,5±0,7	20,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> ATTC 43300	11,0±0,0	0,0±0,0	12,5±0,7	E. Unidos
<i>S. aureus</i> CECT 828	12,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	España
<i>S. aureus</i> S1	12,5±0,7	0,0±0,0	12,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S2	12,5±0,7	0,0±0,0	12,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S3	12,0±0,0	0,0±0,0	10,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S4	13,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S6	12,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S7	12,5±0,7	0,0±0,0	14,5±0,7	Colombia
<i>S. aureus</i> S10	12,5±0,7	0,0±0,0	14,5±0,7	Colombia
<i>S. aureus</i> S11	12,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S15	13,5±2,1	0,0±0,0	10,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S21	12,0±0,0	0,0±0,0	11,0±1,4	Colombia
<i>S. aureus</i> S22	11,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S23	13,0±1,4	0,0±0,0	13,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S26	12,5±0,7	0,0±0,0	12,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S25	13,5±0,7	0,0±0,0	12,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S20	11,5±0,7	0,0±0,0	12,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S5	13,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	Colombia

\* Promedio del diámetro de halo de inhibición en milímetros ± desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado.

Los resultados obtenidos en este estudio también indicaron que el sobrenadante libre de células de las BAL evaluadas no mostraron actividad contra los coliformes.

### VI.3.3.- Caracterización de las cepas ácido lácticas seleccionadas

#### VI.3.3.1.- Caracterización fenotípica

##### VI.3.3.1.1.- Caracterización macroscópica

La cepa QP117 en el agar MRS mostró pequeñas colonias blancas, con elevación convexa, borde definido, sin brillo. En Agar KKA las colonias fueron pequeñas, de color gris con un pigmento negro a su alrededor. La cepa creció en agar China Blue formando colonias de color azul pálido. En agar Mossel formó colonias crema sin precipitado, ni halo y convirtió el medio a Amarillo. También creció en agar SPC formando colonias pequeñas después de 48 h de incubación. Presentó  $\gamma$  hemólisis en agar sangre. La cepa QP117 no creció en agar salado manitol ni tampoco en Baird Parker. Por otro lado, la cepa QP63 mostró pequeñas colonias blancas, con elevación convexa, borde definido, sin brillo, en agar MRS. En Agar KKA las colonias eran pequeñas y grises, producían un pigmento negro alrededor. En agar China Blue formaron colonias de color azul pálido. No creció en los agares Mannitol, Baird Parker, Mossel y SPC. Presentó  $\phi$ hemólisis en agar sangre.

##### VI.3.3.1.2.- Caracterización microscópica

Para la cepa QP117 se observaron cocos Gram positivos agrupados en pequeñas cadenas, no esporulados. Por otro lado, la cepa QP63 al observarse bajo el microscopio presentó morfología de cocos solos o agrupados como diplococos, no esporulados, Gram-positivos.

##### VI.3.3.1.3.- Caracterización bioquímica

La cepa QP117 fue anaerobia facultativa, oxidasa y catalasa negativa. No

presentó movilidad. Hidrolizó 4-MU- $\beta$ -D-glucósido, L-valina-AMC, L-fenilalanina-AMC, L-triptófano-AMC, 4-MU-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida, L-isoleucina-AMC, p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucósido, and esculina, pero no hidrolizó 4MU- $\alpha$ -D-glucósido, L-ácido piroglutámico, L-arginina-AMC, 4MU-fosfato, 4MU- $\beta$ -D-glucurónido, p-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiósido, prolina & leucina-p-nitroanilida, p-nitrofenil-fosfato, p-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltósido, o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido (ONPG) & p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactósido y urea. Fermentó la lactosa, trehalosa, metil- $\alpha$  &  $\beta$ -glucósido, sacarosa, manitol, maltotriosa, fructosa, pero no usó arabinosa ni glicerol.

Así mismo la cepa QP63 creció mejor en un ambiente microaerófilico que en condiciones aeróbicas, fue oxidasa y catalasa negativa. No presentó movilidad. Hidrolizó 4-MU- $\beta$ -D-glucósido, L-penilalanina-AMC, L-triptofano-AMC, p-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltósido y esculina, pero no hidrolizó L-valina-AMC, 4MU-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida, L-isoleucina-AMC, p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucósido, 4MU- $\alpha$ -D-glucósido, L-ácido piroglutámico-AMC, L-arginina-AMC, 4MU-fosfato, 4MU- $\beta$ -D-glucurónido, p-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiósido, prolina y Leucina-p-nitroanilida, p-nitrofenil-fosfato, o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido (ONPG) & p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactósido y urea. La bacteria usó la arginina. Fermentó los carbohidratos, lactosa, trehalosa, maltotriosa, fructosa, pero no fermentó la arabinosa, metil- $\alpha$  &  $\beta$ -glucósido, sacarosa, manitol, pero no usó glicerol (Tabla 12).

**Tabla 12.** Características de las BAL seleccionadas

Característica	Cepa QP117	Cepa QP63	<i>L. lactis</i> ATCC 11454
Morfología	Diplococos	Estreptococos	Estreptococos
Tinción de Gram	+	+	+
Hemólisis en agar sangre	γ	α	α
Oxidasa	-	-	-
Catalasa	-	-	-
4MU-β-D-glucósido (FGC)	+	+	+
L-valina-AMC (FVA)	+	-	-
L-fenilalanina-AMC (FPH)	+	+	+
L-triptofano-AMC (FTR)	+	+	+
4MU-N-acetil-β-D-glucosaminida (FGA)	+	-	-
L-isoleucina-AMC (FIS)	+	-	-
p-nitrofenil-β-D-glucósido (BGL)	+	-	+
Esculina (ESC)	+	+	+
4MU-α-D-glucósido (FGS)	-	-	-
L-ácido piroglutámico-AMC (FPY)	-	-	-
L-arginina-AMC (FAR)	-	-	-
4MU-fosfato (FHO)	-	-	-
4MU-β-D-glucurónido (FGN)	-	-	-
p-nitrofenil-β-D-celobiósido (PCE)	-	-	-
Prolina & Leucina-p-nitroanilida (PLN)	-	-	-
p-nitrofenil-fosfato (PHO)	-	-	-
p-nitrofenil-α-D-maltósido (PAM)	-	+	+
o-nitrofenil-β-D-galactósido(ONPG) & p-nitrofenil-α-D-galactósido (PGO)	-	-	-
Urea (URE)	-	-	-
Trehalosa (TRE)	+	+	+
Lactosa (LAC)	+	+	+
Metil-α & β-glucósido (MAB)	+	-	-
Sacarosa (SUC)	+	-	+
Manitol (MNT)	+	-	-
Fructosa (FRU)	+	+	+
Maltotriosa (MTT)	+	+	+
Arabinosa (ARA)	-	-	-
Glicerol (GRL)	-	-	-
Arginina (ARG)	-	+	+

### VI.3.3.1.3.- Pruebas de resistencia de las cepas seleccionadas

#### VI.3.3.1.3.1.- Efecto de la concentración de NaCl

Los resultados indicaron que las cepas seleccionadas QP117 y QP63 crece muy bien a una concentración no superior al 1 % de NaCl. Cuando la concentración aumenta al 4% su crecimiento se reduce. Los resultados indican que las bacterias no crecen a una concentración de NaCl del 6,5 % (Tabla 13).

**Tabla 13.** Efecto de la de la concentración de NaCl sobre las cepas seleccionadas

Concentración de NaCl (%)	Cepa QP117	Cepa QP63	<i>L. lactis</i> ATCC 11454
0,85	+++	+++	+++
1	++	++	++
4	+	+	+
6,5	-	-	-

+++ Buen crecimiento; ++ Crecimiento moderado; + Poco crecimiento; - No crecimiento

#### VI.3.3.1.3.2.- Efecto de la temperatura

La cepa QP63 y QP117 presentaron una temperatura óptima de 30°C. La cepa QP117 pudo crecer en un rango de temperatura de 4 y 45°C, mientras QP63 no pudo crecer a 45°C (Tabla 14).

**Tabla 14.** Efecto de la temperatura sobre las cepas seleccionadas

Temperatura °C	Cepa QP117	Cepa QP63	<i>L. lactis</i> ATCC 11454
4	+	+	+
15	++	++	++
30	++++	++++	++++
37	+++	+++	+++
42	++	+	+
45	+	-	-

++++ Excelente crecimiento; +++ Buen crecimiento; ++ moderado crecimiento; + Poco crecimiento; - No crecimiento

#### VI.3.3.1.3.3.- Efecto del pH

El pH óptimo para el crecimiento de las cepas QP117 Y QP63 es de 6,5. Las bacterias crecen en ambientes ácidos (>pH 4) y en ligeramente básicos (<pH 9). Las bacterias no crecen en ambientes muy ácidos (pH 4) o muy básicos (pH 12) (Tabla 15).

**Tabla 15.** Efecto de la temperatura sobre el crecimiento las cepas seleccionadas

Temperatura °C	Cepa QP117	Cepa QP63	<i>L. lactis</i> ATCC 11454
2	-	-	-
4	-	-	-
6,5	++	++	++
9	+	+	+
12	-	-	-

++Buen crecimiento; + Poco crecimiento; - No crecimiento

#### VI.3.3.1.3.4.- Susceptibilidad a los antibióticos

Los resultados indicaron que la cepa QP117 era resistente a la kanamicina, la vancomicina, la carbenicilina, la oxacilina, la estreptomina y la levofloxacino, mientras que la cepa QP63 mostraba resistencia a la kanamicina, la carbenicilina, la oxacilina, y la estreptomina. La cepa de referencia *L. lactis* mostró resistencia a la

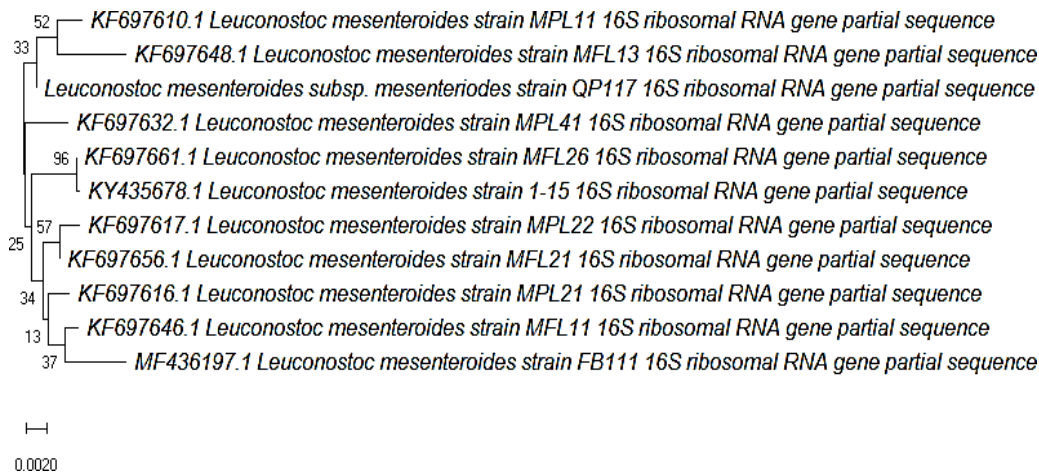
estreptomycin (10 µg), clindamicina (10 µg) y trimetoprima sulfametazol (25 µg) (Tabla 16).

**Tabla 16.** Perfil de sensibilidad de las bacterias del ácido láctico a los antibióticos

Antibiótico	Cepa QP117	Cepa QP63	<i>L. lactis</i> ATCC 11454
Ampicilina (10 µg)	26	26	26
Cloranfenicol (30 µg)	18	22	10
Penicilina (10 µg)	20	30	20
Eritromicina (15 µg)	20	30	26
Kanamicina (30 µg)	0	0	11
Tetraciclina (30 µg)	13	20	30
Vancomicina (30 µg)	0	20	22
Rifampicina (5 µg)	15	13	10
Carbenicilina (100 µg)	0	0	25
Oxacilina (1 µg)	0	0	15
Estreptomycin (10 µg)	0	0	0
Clindamicina (10 µg)	20	20	0
Levofloxacin (5 µg)	0	15	20
Trimetoprima sulfa (25 µg)	20	25	0

#### VI.3.3.2.- Identificación molecular de las cepas ácido lácticas seleccionadas

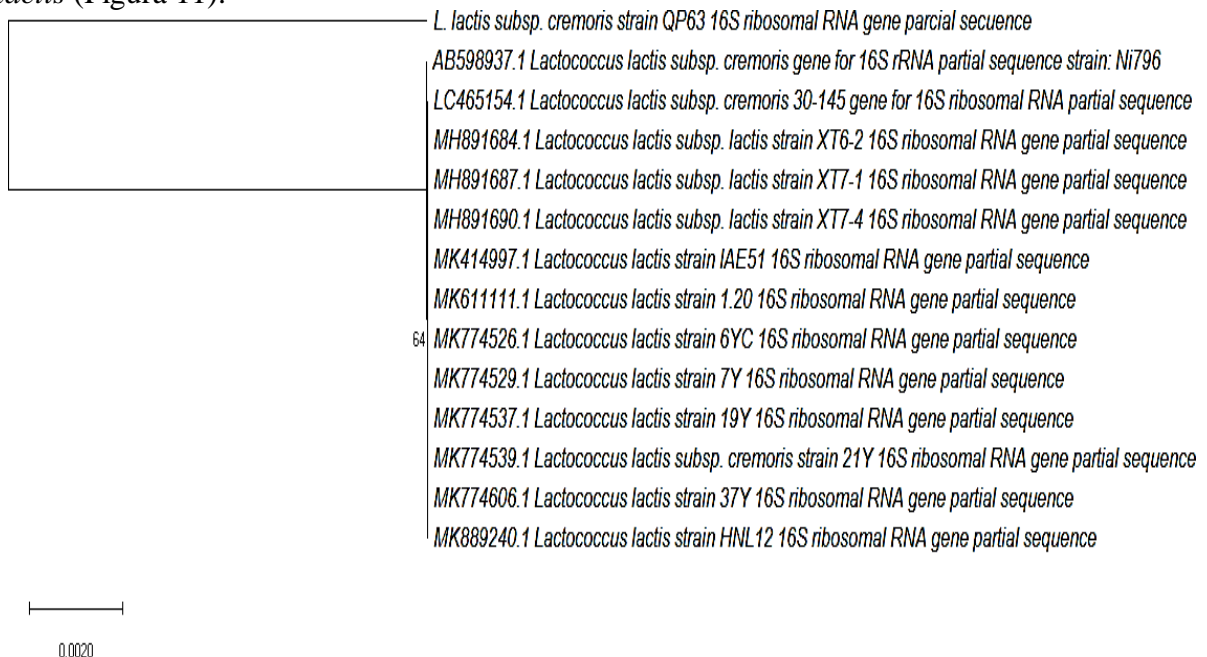
La secuencia del gen ARNr 16S de la cepa QP117 mostró un 98,8 % de similitud con *L. mesenteroides* (Figura 10).



**Figura 10.** Análisis filogenético de la cepa QP117 y especies relacionadas el método de neighbor joining. Los valores Bootstrap (%) son indicados en los nodos, las barras de la escala representan 0.002 sustitución/sitio

Por otro lado, la cepa QP63 mostró un 97,4 % de similitud con *Lactococcus*

*lactis* (Figura 11).

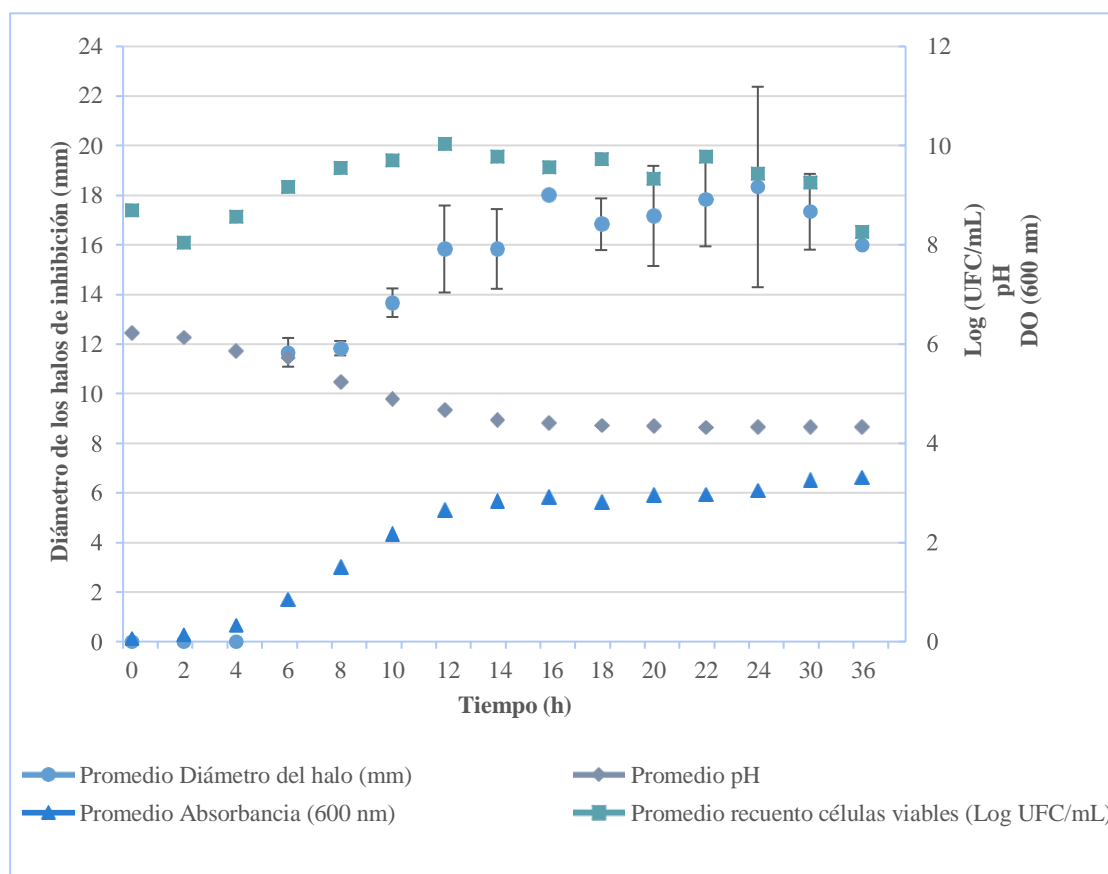


**Figura 11.** Análisis filogenético de la cepa QP63 y especies relacionadas el método de neighbor joining. Los valores Bootstrap (%) son indicados en los nodos, las barras de la escala representan 0,02 sustitución/sitio

## VI.4.- Purificación y caracterización de las sustancias antibacterianas producidas por las bacterias ácido lácticas seleccionadas

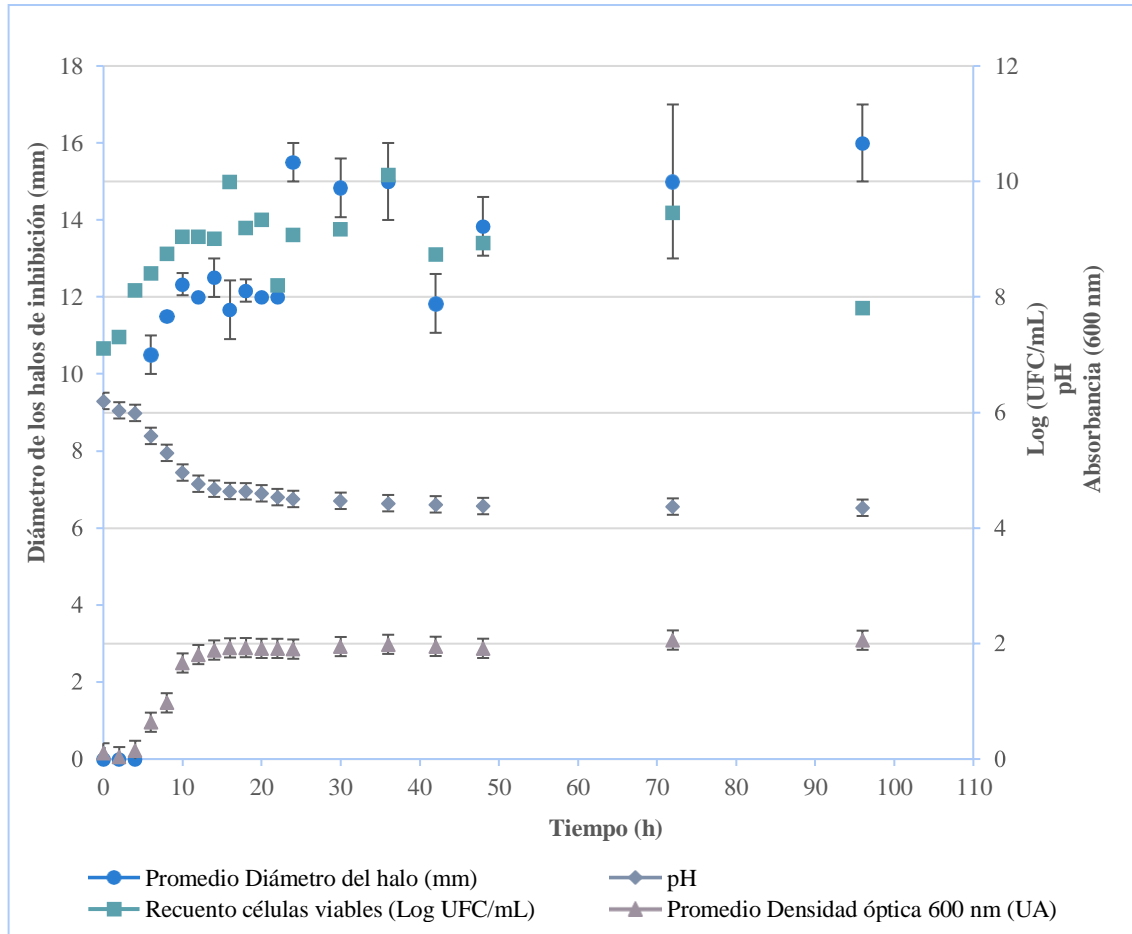
### VI.4.1.- Curva de crecimiento de las bacterias ácido lácticas productoras de sustancias antibacterianas

La cepa *Leuconostoc mesenteroides* QP117 produjo la mayor actividad antimicrobiana en la fase de crecimiento exponencial. La máxima actividad antimicrobiana se obtuvo a las 16 h y se mantuvo en el tiempo hasta la hora 36, simultáneamente la acidez del medio de cultivo disminuyó hasta pH 4 y se mantuvo con el mismo valor desde la hora 12 hasta la hora 36 (Figura 12).



**Figura 12.** Cinética de crecimiento y de producción de la bacteriocina por la cepa *L. mesenteroides* QP117

De otro lado, la cepa de *L. lactis* QP63 también produjo la mayor actividad de la sustancia antimicrobiana en la fase exponencial de crecimiento. No obstante, para esta bacteria la actividad antimicrobiana se produjo más lentamente que *L. mesenteroides* QP117, su mayor actividad se obtuvo a partir de la hora 24 y se mantuvo en el tiempo. A su vez el pH en el medio de cultivo disminuyó a 4 y se mantuvo con el mismo valor hasta la hora 70 (Figura 13).

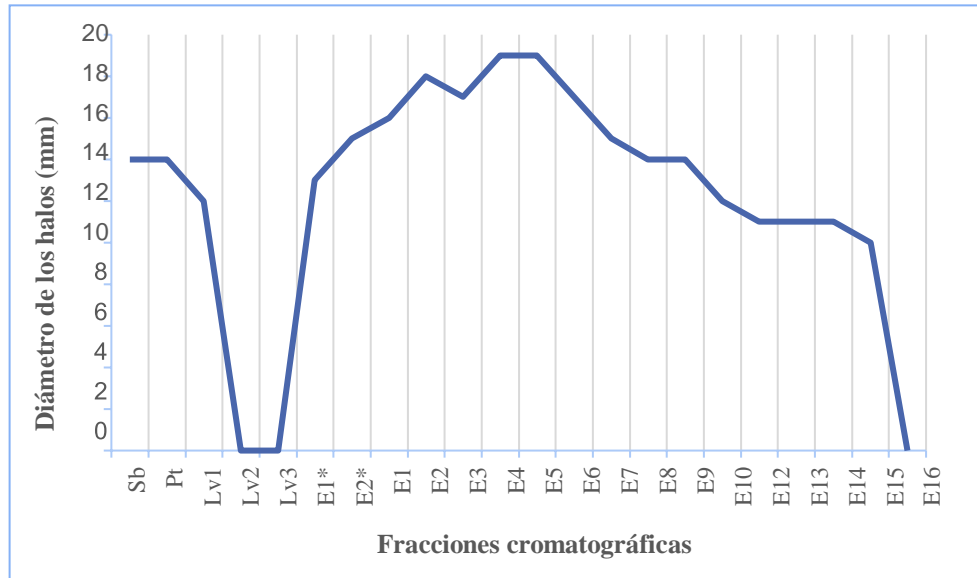


**Figura 13.** Cinética de crecimiento y de producción de la bacteriocina por la cepa *L. lactis* QP63

#### VI.4.2.- Purificación parcial de las sustancias antibacterianas por cromatografía de intercambio catiónico

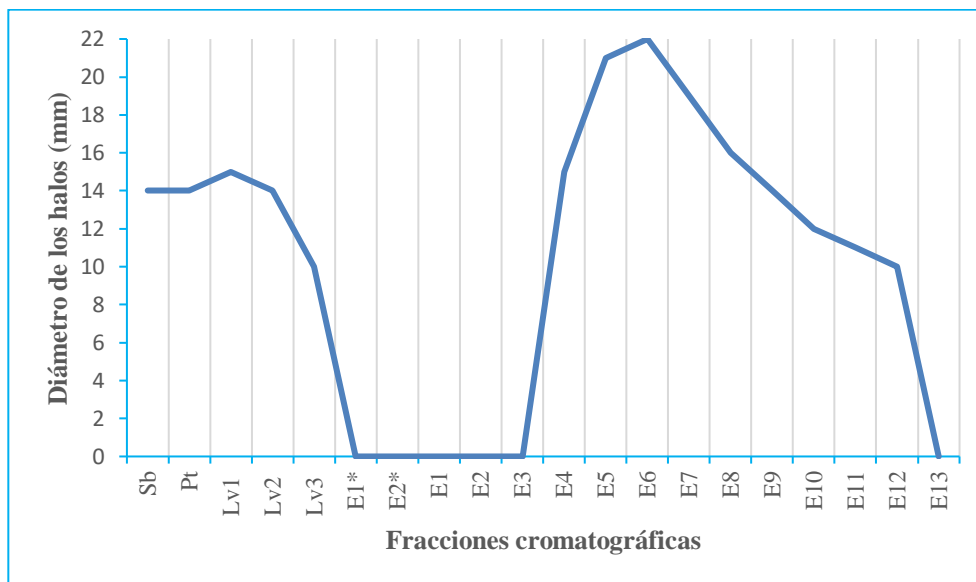
Luego de realizar la cromatografía de intercambio catiónico se encontró que

los eluidos de *L. mesenteroides* cepa QP117 tuvieron actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ATTC 7644. La mayor actividad antimicrobiana se presentó en los eluidos E4 y E5 con halos de 19 mm (Figura 14).



**Figura 14.** Purificación de las bacteriocina producida por *L. mesenteroides* QP117

De otro lado, los eluidos E3 a E12, producto de la purificación por cromatografía de intercambio iónico de la fermentación de *L. lactis* cepa QP63, tuvieron actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ATTC 7644. El eluido con mayor actividad antimicrobiana fue E6, el cual presentó halos de 22 mm de diámetro (Figura 15). La purificación por cromatografía incrementó la actividad antimicrobiana de ambas bacterias.

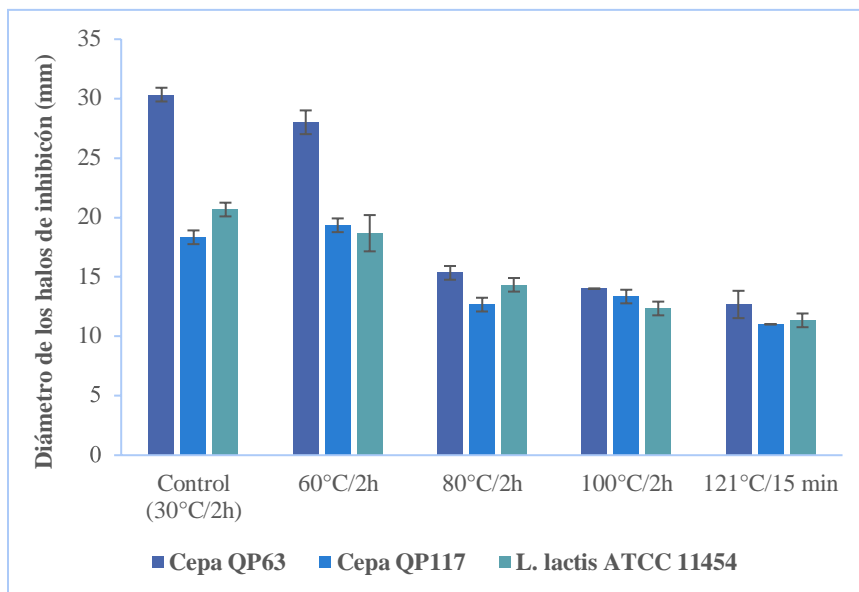


**Figura 15.** Purificación de las bacteriocina producida por *L. lactis* QP63

#### VI.4.3.- Caracterización de las sustancias antibacterianas

##### VI.4.3.1.- Efecto de la temperatura sobre las sustancias antibacterianas

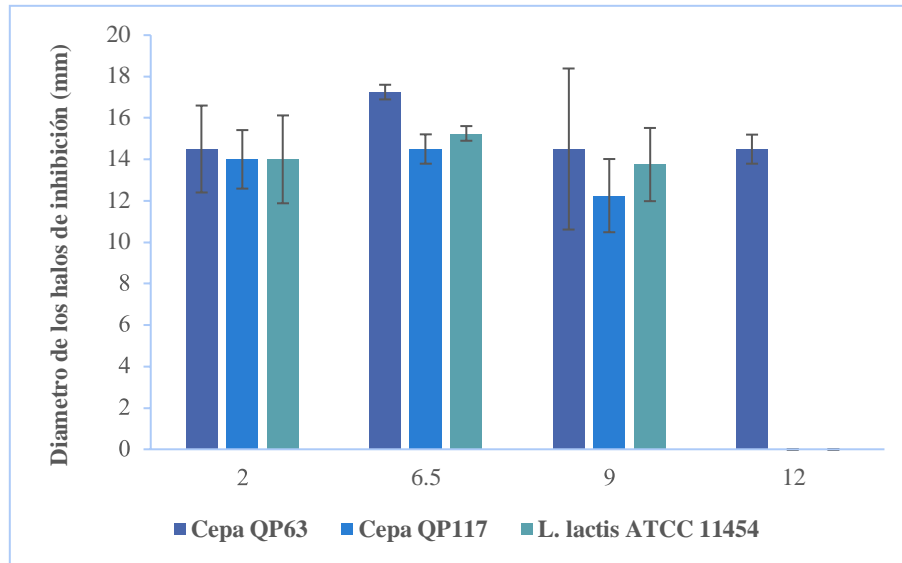
Las sustancias antibacterianas producidas por la cepa *L. mesenteroides* QP117 y *L. lactis* QP63 pierden parcialmente su actividad, cuando la temperatura sube por encima de los 80°C. Sin embargo, su actividad se mantiene a pesar de ser sometidas al proceso de autoclavado (121°C, 15 libras de presión, 15 minutos). No se encontraron diferencias entre los halos producidos entre los eluidos de las diferentes cepas evaluadas (Figura 16).



**Figura 16.** Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de los eluidos producidos por las cepas y *L. mesenteroides* QP117 y *L. lactis* QP63

#### VI.4.3.2.- Efecto del pH sobre las sustancias antibacterianas

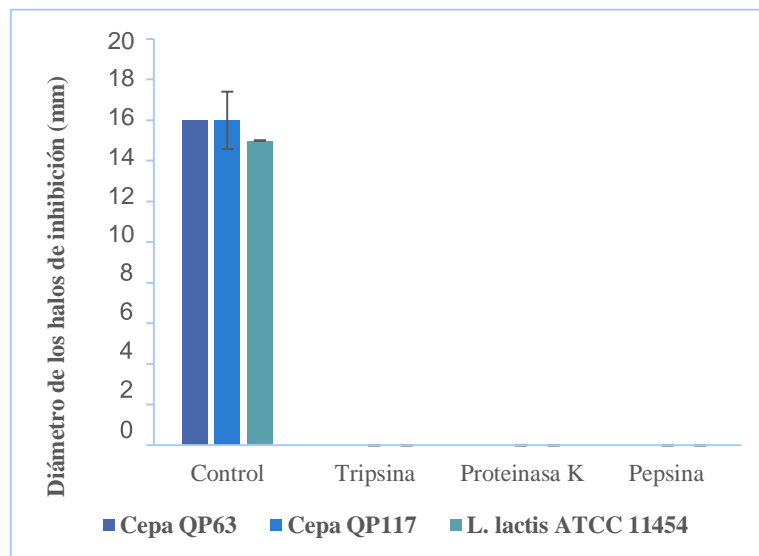
La actividad antibacteriana de los eluidos cromatográficos de *L. lactis* QP63 y *L. mesenteroides* QP117 no fue afectada en un rango de pH entre 2 y 9. Tampoco fue afectado el sobrenadante libre de células de la cepa *L. lactis* ATCC 11454. Los resultados indicaron que los eluidos cromatográficos de *L. lactis* QP63 no perdieron su actividad a pH 12 (Figura 17).



**Figura 17.** Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de los eluidos producidos por las cepas y *L. mesenteroides* QP117 y *L. lactis* QP63

#### VI.4.3.3.- Efecto de las enzimas proteolíticas sobre las sustancias antibacterianas

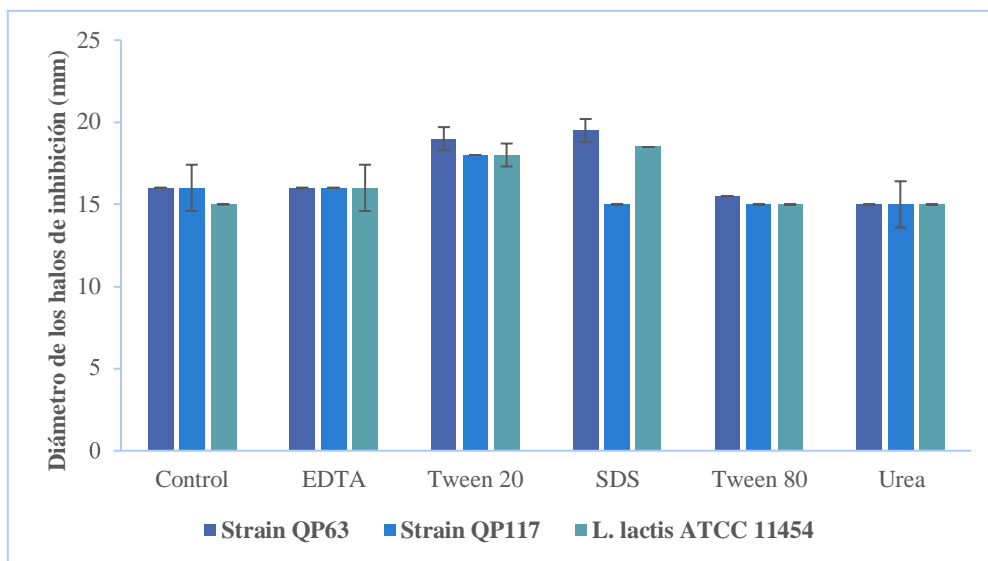
El tratamiento con enzimas proteolíticas afectó la actividad antimicrobiana de los eluidos (Figura 18).



**Figura 18.** Efecto de las proteasas sobre la actividad antimicrobiana de los eluidos producidos por las cepas *L. mesenteroides* QP117 y *L. lactis* QP63

#### VI.4.3.4.- Efecto de los compuestos químicos sobre las sustancias antibacterianas

La urea, sales como el EDTA y detergentes como el Tween 20, Tween 80 y Dodecilsulfato sódico (SDS) no disminuyen la actividad de los eluidos, al contrario, se pueden evidenciar que sustancias como el Tween 20 y SDS podrían potenciar la acción de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de BAL (Figura 19).



**Figura 19.** Efecto de las sustancias químicas sobre la actividad antimicrobiana de los eluidos producidos por las cepas *L. mesenteroides* QP117 y *L. lactis* QP63

#### VI.4.3.5.- Espectro de actividad de las sustancias antimicrobianas parcialmente purificadas

Las sustancias antimicrobianas parcialmente purificadas tuvieron actividad frente algunas cepas Gram positivas como *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus faecium* ATCC 33667, *Lactobacillus casei* ATCC 393. Sin embargo, no tuvieron actividad frente a las cepas de *S. aureus*, *S. saprophyticus* ATCC 49907, *B. thuringiensis* ATCC 33679, *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386. No obstante, los eluidos cromatográficos de *L. mesenteroides* QP117 inhibieron el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Clostridium perfringens* ATCC 13124 (Tabla 17).

**Tabla 17.** Espectro de actividad antibacteriana de las sustancias antibacterianas parcialmente purificadas. Como control positivo se ha incluido la nisina

Cepa indicadora*	Cepa QP63	Cepa QP117	Nisina 6 mg/L	Nisina 12 mg/L	Origen
<i>S. aureus</i> ATTC 43300	0,0±0,0	0,0±0,0	11,0±0,0	13,5±0,7	E. unidos
<i>S. aureus</i> CECT 828	0,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	12,0±0,0	España
<i>S. aureus</i> S1	0,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	13,5±0,7	Colombia
<i>S. aureus</i> S2	0,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	12,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S3	0,0±0,0	0,0±0,0	11,5±0,7	13,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S4	0,0±0,0	0,0±0,0	13,5±0,7	14,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S6	0,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	12,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S7	0,0±0,0	0,0±0,0	13,5±2,1	15,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S10	0,0±0,0	0,0±0,0	13,5±2,1	15,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S11	0,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	12,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S15	0,0±0,0	0,0±0,0	12,5±0,7	12,5±0,7	Colombia
<i>S. aureus</i> S21	0,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	13,0±1,4	Colombia
<i>S. aureus</i> S22	0,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	13,5±0,7	Colombia
<i>S. aureus</i> S23	0,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	13,0±0,0	Colombia
<i>S. aureus</i> S26	0,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	14,0±1,4	Colombia
<i>S. aureus</i> S25	0,0±0,0	0,0±0,0	13,0±0,0	14,5±0,7	Colombia
<i>S. aureus</i> S20	0,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	13,5±0,7	Colombia
<i>S. aureus</i> S5	0,0±0,0	0,0±0,0	12,5±0,7	12,5±0,7	Colombia
<i>L. monocytogenes</i> ATTC 7644	22,0±0,0	21,0±0,0	16,0±0,0	21,0±0,0	E. unidos
<i>L. monocytogenes</i> CECT 4032	15,0±0,0	21,0±0,0	12,5±0,7	15,0±1,4	España
<i>L. monocytogenes</i> L1	22,0±0,0	21,0±0,0	18,0±0,0	22,5±0,7	Colombia
<i>L. monocytogenes</i> L4	22,0±0,0	21,0±0,0	17,5±0,7	24,0±0,0	Colombia
<i>L. monocytogenes</i> L5	22,0±0,0	21,0±0,0	19,5±0,7	25,0±0,0	Colombia
<i>L. monocytogenes</i> L6	22,0±0,0	21,0±0,0	20,5±2,1	23±1,41	Colombia
<i>L. monocytogenes</i> L7	22,0±0,0	21,0±0,0	23,0±1,4	25,0±2,8	Colombia
<i>L. monocytogenes</i> L8	22,0±0,0	21,0±0,0	21,0±0,0	32,0±0,0	Colombia
<i>L. innocua</i> L3	22,0±0,0	21,0±0,0	20,0±0,0	32,0±0,0	Colombia
<i>L. lactis</i> ATTC 11454	12,0±0,0	12,8±0,35	12,0±0,0	12,0±0,0	E. unidos
<i>L. lactis</i> strain QP63	15,5±0,7	15,3±0,35	14,3±0,4	16,3±1,7	Colombia
<i>L. mesenteroides</i> strain QP117	21,0±0,0	20,5±0,70	21,0±1,4	21,0±1,4	Colombia
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	14,6±0,6	15,0±0,0	ND	ND	E. unidos
<i>E. faecium</i> ATCC 33667	14,0±0,0	12,0±0,0	ND	ND	E. unidos
<i>L. casei</i> ATCC 393	16,0±0,0	15,3±0,5	ND	ND	E. unidos
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	0,0±0,0	17,6±0,6	ND	ND	E. unidos
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	0,0±0,0	13,0±0,0	ND	ND	E. unidos

\*No se detectó actividad frente a las bacterias Gram negativas ensayadas.

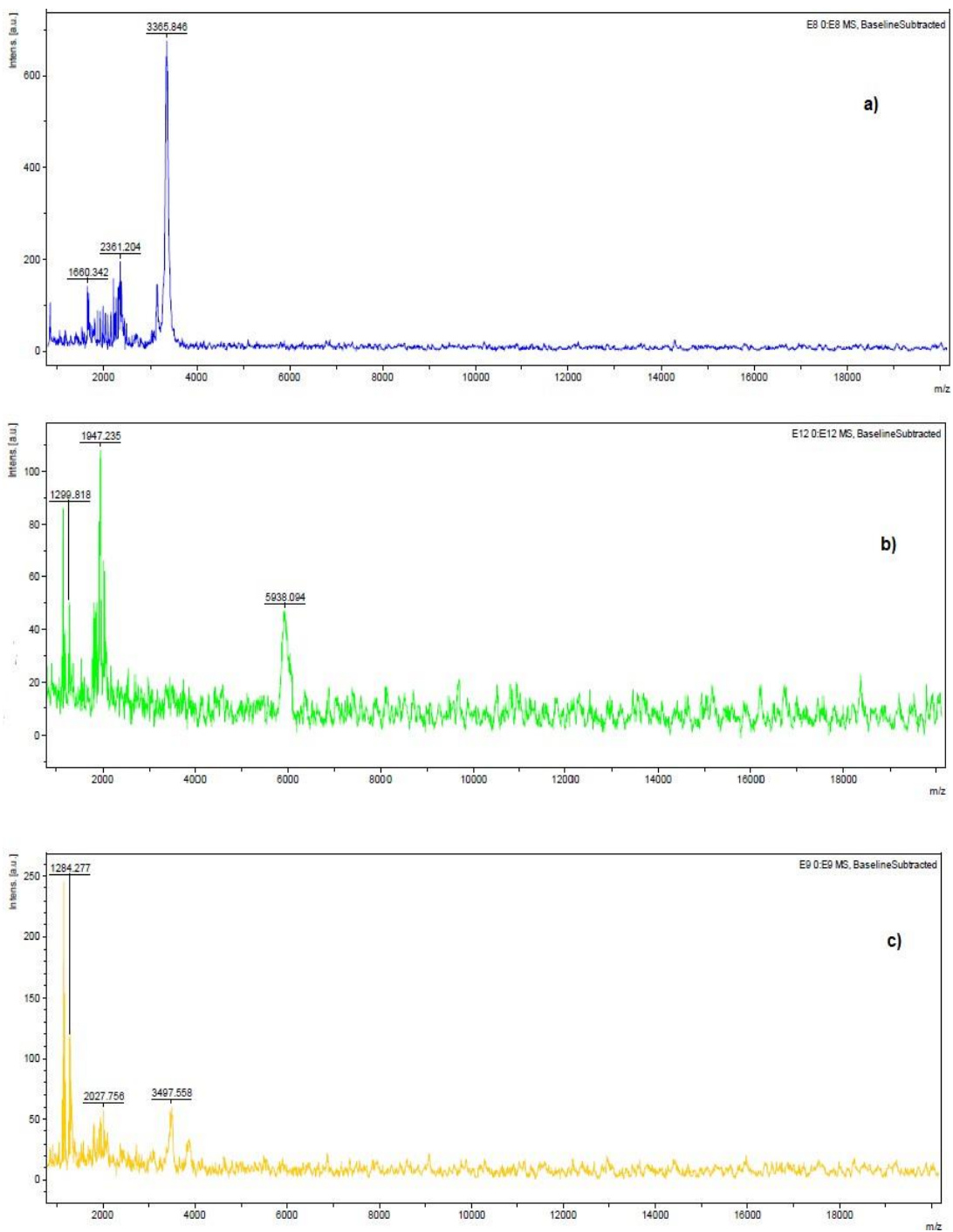
Los resultados también indicaron que la nisina inhibió a las cepas de *Listeria monocytogenes*. Los halos de inhibición con la nisina a una concentración de 12 mg/L fueron mayores que los obtenidos con la nisina a una concentración de 6 mg/L. A si mismo, se observó que los halos de inhibición producidos por los eluidos cromatográficos de las cepas seleccionadas fueron mayores que los de la nisina a 6 mg/L.

Los resultados también mostraron que los eluidos cromatográficos inhibieron a las BAL seleccionadas. Por otro lado, las BAL también fueron inhibidas por nisina a niveles de 6 mg/L y 12 mg/L (Tabla 17). Ninguna de las sustancias antimicrobianas incluyendo al control positivo (nisina 6 y 12 mg/L) tuvieron actividad frente a las bacterias Gram negativas evaluadas.

#### VI.4.3.6.- Determinación del peso molecular de las sustancias antibacterianas por MALTI-TOF

El análisis por MALDI-TOF-MS de la nisina comercial (control positivo), permitió la identificación de tres picos específicos uno de 1681,557, otro de 2361,050 y otro de 3365,8 masa/carga. De otro lado, el análisis de las fracciones semi-purificadas por cromatografía de intercambio iónico de *L. lactis* cepa QP63 permitió también la identificación de tres picos (masa/carga), uno de 1299,818, otro de 1947,235 y otro en menor proporción de 5938,94. Para *L. mesenteroides* QP117, se identificaron también tres picos específicos (masa/carga), uno de 1284,277, otro de 2027,756 y otro pico de 3497,558 (Figura 20).

De acuerdo con los valores obtenidos, uno de los picos detectados para la cepa *L. lactis* QP63 (5938,94 masa/carga) se encuentra en el rango de las lacticinas Q (5917,05) y Z (5959,09) de *L. lactis* QU 14. Así mismo, uno de los picos obtenidos para *L. mesenteroides* QP117 (3497,558 masa/carga) es muy similar a la leukocina B (3484,5) de *Leuconostoc mesenteroides* TA33a.



**Figura 20.** Espectros representativos MALDI-TOF-MS para las sustancias antimicrobianas producidas por bacterias aisladas del queso Paipa. a). Nisina comercial al 1%. b). Eluido cromatográfico de *L. lactis* cepa QP63. c). Eluido cromatográfico de *L. mesenteroides* cepa QP117

## VII.- DISCUSIÓN

En comparación con los quesos convencionales donde el tratamiento térmico de la leche y la rápida acidificación producida por cultivos iniciadores añadidos minimizan la supervivencia y proliferación de bacterias potencialmente patógenas, los quesos artesanales, como el queso Paipa, se basan en la fermentación natural donde las bacterias del ácido láctico no siempre logran desplazar a otras poblaciones microbianas que pueden suponer riesgos para la salud humana o pueden causar deterioro (Abdel-Hameid et al., 2019; Herrera et al., 2016). Existe un delicado equilibrio entre preservar los sabores únicos de los quesos artesanales y garantizar la seguridad del queso.

Según los resultados obtenidos en este estudio y como era de esperar para un producto lácteo fermentado, las bacterias del ácido láctico son el principal grupo bacteriano encontrado durante la maduración del queso. Los resultados obtenidos por secuenciación masiva fueron similares a los obtenidos mediante técnicas dependientes de cultivo, donde los recuentos de BAL presentes en los quesos alcanzaron valores superiores a otros grupos microbianos como coliformes y estafilococos. Recuentos similares de BAL ya habían sido obtenidos en otros tipos de quesos (Rodríguez Villanueva, 2007).

Los miembros del género *Lactococcus* parecen ser los principales actores de la fermentación del ácido láctico en el queso Paipa. Otros géneros de bacterias del ácido láctico, como *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* o *Lactobacillus* también fueron detectados, pero mostraron grandes variaciones en sus abundancias relativas entre las muestras. En particular, las unidades taxonómicas operativas (UTOs) asignadas al género *Enterococcus* se detectaron en todas las muestras de queso y mostraron las mayores abundancias relativas en muestras del productor A, mientras que las muestras del productor F mostraron la más baja. Enterococos se pueden encontrar en muchos hábitats diferentes, como el suelo, agua, alimentos, y el tracto gastrointestinal de los animales. La presencia de enterococos en los alimentos es un tema controvertido. Los enterococos se encuentran comúnmente en

quesos elaborados con leche cruda o pasteurizada, donde pueden desempeñar varios papeles beneficiosos en la fermentación y maduración del queso (Giraffa, 2003).

Debido a sus actividades proteolíticas, esterolíticas y lipolíticas, descomposición del citrato y producción de diacetilo, y otros compuestos volátiles importantes, enterococos participan en el desarrollo del sabor específico del queso, sabor y textura (Vandera, et al., 2019; Giraffa, 2003). Los enterococos también puede tener un impacto negativo en los alimentos (incluidos los quesos) a través de la producción de aminas biogénicas (Barbieri et al., 2019; Hanchi et al., 2018). Existe una preocupación por la presencia de enterococos en los alimentos, ya que estas bacterias también pueden comportarse como patógenos oportunistas y causar diferentes infecciones en los seres humanos (García-Solache & Rice, 2019; Hanchi et al., 2018). Los enterococos también son preocupantes debido a su capacidad para adquirir y transferir resistencias a los antibióticos (García-Solache & Rice, 2019; Gaglio et al., 2016). Por lo tanto, se deben realizar más estudios para determinar la seguridad de los enterococos de los quesos Paipa, especialmente el potencial de producción de aminas biogénicas y la presencia de factores de virulencia y rasgos de resistencia a los antibióticos.

Los resultados también indicaron que otros grupos bacterianos toxigénicos o patógenos y bacterias alterantes pueden estar presentes durante la maduración y el producto terminado. Las muestras de queso analizadas presentaron grandes abundancias relativas de UTOs asignadas al género *Staphylococcus*, especialmente las muestras del productor C. Por el contrario, las abundancias relativas en la mayoría de las muestras del productor A y en todas las muestras del productor F fueron muy bajas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante técnicas dependientes de cultivo, donde las poblaciones de *Staphylococcus* spp. variaron entre los productores. Esperábamos que los recuentos de las muestras de quesos comercializados por empresas formales fueran menores que los de las empresas informales. Pero no fue así, todas las muestras obtuvieron recuentos más altos que los límites permisibles según la normatividad colombiana. Las diferencias

observadas entre los productores con respecto a los estafilococos podrían atribuirse a diferencias en las prácticas higiénicas. Al realizar el aislamiento e identificación de especies bacterianas de este género a partir del queso, se encontró que el 56 % correspondía a especies de *S. aureus* y el 44 % a *S. saprophyticus*. Los estafilococos son bacterias Gram positivas anaerobias facultativas que tiene una alta osmotolerancia. Habita en las membranas mucosas, la piel, el cabello y la nariz de las personas. La presencia de miembros del género *Staphylococcus* en el queso Paipa debe ser motivo de preocupación, ya que este grupo bacteriano puede contener especies o cepas que pueden causar infecciones humanas o producir enterotoxinas. *S. saprophyticus* participa con frecuencia en infecciones del tracto urinario humano (Argemi et al., 2019). Por otro lado, *S. aureus* es el principal productor de enterotoxinas dentro del género, puede crecer en la leche y en el queso y producir enterotoxinas estables al calor que cuando se ingiere producen la intoxicación alimentaria estafilocócica (Fisher et al., 2018). El crecimiento de *S. aureus* en los quesos y la producción de enterotoxinas están influenciados por las condiciones ambientales, como la temperatura, el pH, la actividad del agua, la concentración de sal y la competencia bacteriana (Bellio et al., 2019). La presencia de *Staphylococcus* sp. es un indicador de una mala manipulación de los alimentos. Las principales fuentes de estafilococos en el queso podrían ser las ubres de las vacas lactantes y las manos de los queseros (Kümmel et al., 2016). Según la tradición familiar, durante la fase de amasado del queso Paipa, es esencial que la persona entre en contacto con el queso porque el calor corporal transmitido por las manos, da a la masa características especiales únicas como una textura semifina que no se obtienen mediante otro método de amasado (Robayo & Pachón, 2013). La práctica tradicional de moldeo a mano y el “volteo” diario del queso Paipa manualmente, también podría explicar la presencia de estafilococos en los quesos.

Así mismo la presencia de estafilococos indicó que las vacas podrían haber tenido mastitis. Según Neira y De Silvestri, en las granjas donde se recoge la leche, no se realizan pruebas permanentes para determinar la mastitis (Neira & de Silvestri, 2006). La contaminación de la leche puede prevenirse mediante un plan de salud

animal donde se controle que los animales enfermos no sean ordeñados, un plan donde se cumplan las buenas prácticas de ordeño, como la desinfección de las ubres antes de ordeñar, donde se estipule un lugar de ordeño fijo, ordenado y limpio, lejos de los puntos críticos de contaminación, como también un lavado riguroso de manos, el uso de equipo de protección personal (máscara, guantes, sombrero) y una buena desinfección de equipos y utensilios. Las medidas para abordar este problema deben basarse en la combinación de estrategias educativas permanentes sobre todo con los campesinos y productores para permitir estas buenas prácticas de ordeño, ya que el esfuerzo y el buen trabajo realizado por los productores con buenas prácticas se pierde cuando las leches se mezclan para la fabricación de queso.

De otro lado todas las muestras de queso arrojaron altos porcentajes de UTOs pertenecientes a *Proteobacterias*. La mayoría de los miembros de este grupo que se encuentran en el queso, incluyeron bacterias que deterioran los alimentos, pero también algunos patógenos humanos importantes. La Familia *Enterobacteriaceae* fue uno de los dos principales grupos bacterianos dentro de *Proteobacterias* en el queso Paipa. Estaban presentes en todas las muestras de queso. Estos resultados fueron corroborados mediante los análisis microbiológicos dependientes de cultivo, todas las muestras presentaron coliformes por encima de los límites permisibles de acuerdo con las regulaciones colombianas. Esperábamos que los recuentos de coliformes de las empresas informales superaran en dos o tres órdenes de magnitud los recuentos de las empresas formales. Sin embargo, no hubo una diferencia marcada entre las empresas formales y las empresas informales con respecto al cumplimiento de la norma. Incluso algunas empresas informales tenían recuentos de coliformes más bajos que las empresas formales. Esto es probable porque las empresas informales producen su propia leche. Por lo tanto, no necesitan transportar la leche, tampoco necesitan mezclarla con la de otros hatos ganaderos, lo cual hace posible que puedan controlar todo el proceso, reduciendo la contaminación cruzada.

Estudios realizados por Neira y De Silvestri evaluaron la calidad microbiológica de la leche cruda con la que elaboraban el queso Paipa antes y

después de un entrenamiento en buenas prácticas de ordeño (Neira & de Silvestri, 2006). La leche presentó recuentos totales de coliformes que iban desde  $1,8 \times 10^2$  UFC/mL a  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL antes del entrenamiento y  $3,8 \times 10^3$  UFC/mL a  $1,8 \times 10^8$  UFC/mL después de la capacitación, lo cual indicó que en algunas granjas la leche sufría contaminación cruzada con materia fecal, por lo que los campesinos no aplicaron las buenas prácticas de ordeño impartidas durante la capacitación, tampoco llevaron a cabo condiciones adecuadas de transporte y almacenamiento. Ellos llegaron a la conclusión de que el principal problema es la higiene personal de los ordeñadores y la incorrecta desinfección de los equipos y utensilios. Encontraron que el 80% de los ordeñadores no se lavan las manos antes de ordeñar, el 50% no lavan las ubres antes de ordeñar, el 70% lava las cantinas, pero no las desinfectan, y en el 90% de los casos, la leche se transporta a temperatura ambiente. Estos problemas de higiene también han sido evidentes durante el ordeño en diferentes “hatos” ganaderos en Colombia (Trujillo et al., 2010).

La mayoría de las UTOs detectadas de coliformes en muestras de queso, pertenecieron al género *Enterobacter*. Sin embargo, también se detectaron miembros potencialmente patógenos de *Enterobacteriaceae*, como *Serratia* (que era relevante en tres muestras del productor C) y *Citrobacter* (que era relevante en algunas muestras del productor F). Por otro lado, las técnicas dependientes de cultivo permitieron aislar e identificar diferentes especies de enterobacterias. Las especies que predominaron fueron *Escherichia coli* con un (22%), *Citrobacter freundii* (13,9%), *Proteus mirabilis* (8,33 %) *Citrobacter braakii*, (8,33 %) *Serratia marcescens* (5,5 %). Otras especies que se pudieron aislar e identificar en el presente estudio son *Hafnia alvei*, *Hafnia paralvei*, *Raoultella ornithinolytica*, *Shigella dysenteriae*, *Acinetobacter baumannii* y *Morganella morganii*. Elbagory y colaboradores obtuvieron resultados similares para los quesos elaborados con leche cruda en Egipto (Elbagory et al., 2016).

La mayoría de los coliformes son inofensivos y viven en los intestinos de los seres humanos y los animales. Estos realizan importantes transformaciones

bioquímicas en quesos que influyen significativamente en sus características sensoriales (Chaves-Lopez et al., 2006). Sin embargo, dentro de este grupo, hay bacterias potencialmente patógenas. Algunos serotipos de *E. coli* causan enfermedades transmitidas por los alimentos. Los síntomas de la enfermedad incluyen principalmente calambres abdominales y diarrea. La mayoría de los pacientes se recuperan dentro de 10 d. Sin embargo, en algunos casos, puede llegar a ser mortal (Fratamico et al., 2016; Miri et al., 2017). *Shigella dysenteriae* es una enterobacteria importante para la inocuidad de los alimentos porque produce disentería bacilar. Las bacterias producen una poderosa y mortal enterotoxina llamada toxina Shiga (Shahin et al., 2019).

*Citrobacter* sp. representa uno de los géneros de coliformes ubicuos más frecuentemente aislados. Géneros como *Serratia* o *Hafnia* representan coliformes ambientales. Algunos pueden crecer en leche a temperaturas de refrigeración y pueden causar bacteriemia en personas inmunodeprimidas (Masiello et al., 2016). *Citrobacter* sp., *Morganella morganii*, y *Serratia marcescens* son prominentes oportunistas responsables de infecciones en las vías respiratorias, vías urinarias, sistema nervioso central, e infecciones intra-abdominales y del torrente sanguíneo (Dhanashekar et al., 2012).

El género *Aeromonas* también fue muy representativo en las muestras de queso Paipa. Las UTOs asignadas a este grupo bacteriano mostraron las mayores abundancias relativas al comienzo del período de maduración (especialmente en muestras de queso del productor C y también en uno de los lotes de los productores A y F). La presencia de *Aeromonas* en la leche y los productos lácteos se ha notificado en varios estudios dependientes de cultivo, por ejemplo, en muestras de leche cruda, en leche cruda de vaca, yogur natural local y queso Domiati de Egipto (Ahmed et al., 2014) quesos griegos Anthotyros y Manouri (Melas et al., 1999), en queso Urfa de Turquía (Uraz et al., 2008) y en quesos Villalón en España (Santos et al., 1996). *Aeromonas* spp. también se ha descrito en varios estudios sobre leche y quesos frescos de Brasil (Freitas et al., 1993). *Aeromonas* spp. fue aislada durante el

procesamiento del queso Minas Frescal; fue aislada en leche cruda y pasteurizada, en el medio ambiente y en las manos de los manipuladores. Durante el procesamiento de queso colonial, *Aeromonas* spp. se aisló en el agua, leche cruda, después del tratamiento térmico y cuajada, así como en las manos y utensilios de los manipuladores (Cereser et al., 2013).

*Aeromonas* spp. es un importante microorganismo emergente en enfermedades transmitidas por los alimentos (Schuetz, 2019; Janda & Abbott, 2010). *Aeromonas* spp. puede causar enfermedades humanas, que van desde la gastroenteritis hasta la enfermedad invasiva. La causa más común de la infección por *Aeromonas* es la ingestión de agua contaminada, pero la transmisión también puede ocurrir a través de alimentos contaminados (Schuetz, 2019; Janda & Abbott, 2010). Según los resultados del presente estudio, *Aeromonas* debe considerarse una bacteria preocupante por la seguridad microbiológica del queso Paipa.

Las UTOs asignadas al género *Acinetobacter* también se detectaron en todas las muestras de queso, mostrando las mayores abundancias relativas en muestras de los productores A y F. Las especies de *Acinetobacter* son ubicuas, viven en el suelo, el agua y diferentes tipos de alimentos, incluyendo leche y queso, siendo a menudo asociadas con el deterioro (Cousin, 1982).

Un estudio informó que aislados del género *Acinetobacter* durante la maduración del queso Camembert mostraron actividad lipolítica y fueron capaces de utilizar citrato, dos propiedades que podrían explicar su capacidad para crecer en el ecosistema del queso (Addis et al., 2001). Otro estudio informó que los aislados de *Acinetobacter* del queso mozzarella eran proteolíticos (Baruzzi et al., 2012). *Acinetobacter* spp. ha sido detectada por secuenciación masiva en varios estudios, incluyendo leche bovina cruda de camiones cisterna (Kable et al., 2016), tinas y otras muestras ambientales (Stellato et al., 2015), leche, cuajada y queso Pico (un queso artesanal fabricado a partir de leche cruda de vaca cruda en pequeñas empresas lácteas en Portugal) (Aldrete-Tapia et al., 2014; Riquelme et al., 2015) y en queso

chino Rushan (Xue et al., 2018). La presencia de *Acinetobacter* en el queso Paipa podría ser importante no sólo como una indicación de mala higiene y contaminación ambiental, sino también porque los miembros de este grupo también pueden llevar genes de resistencia a los antibióticos.

*L. monocytogenes* fue aislada de los quesos Paipa comercializados por microempresas formales e informales. Los resultados del presente estudio sugieren que el consumo de queso Paipa supone un alto riesgo de listeriosis. *L. monocytogenes* es un patógeno transmitido por alimentos que puede causar abortos, enfermedades gastrointestinales, septicemia y meningoencefalitis. La listeriosis presenta altas tasas de mortalidad en niños, ancianos, inmunocomprometidos, y personas sometidas a trasplante de órganos (WHO, 2018b). A nivel mundial, la tasa de mortalidad aumentó entre el 20 y el 30% (Montero et al., 2015). En 2019 se notificaron en España un total de 222 casos confirmados relacionados con un brote asociado al consumo de un producto de cerdo asado y refrigerado (WHO, 2019). *L. monocytogenes* ha sido descrita a nivel mundial en quesos frescos y maduros elaborados con leche cruda (Zhu et al., 2017; Rudolf & Scherer, 2001). En Colombia, los quesos artesanales tienen la mayor prevalencia de *L. monocytogenes* (Soto-Varela et al., 2018; Ocampo et al., 2019; Gallegos et al., 2007). Muñoz y colaboradores analizaron 1424 aislados de *Listeria* spp., obtenidos de diferentes muestras de alimentos en Colombia. El 89% correspondió a *L. monocytogenes*, de los cuales el 57,6% pertenecía al serotipo 4b altamente virulento (Muñoz et al., 2011). En Colombia se han notificado en los últimos tres años los siguientes brotes: en 2017, 2 (1 en Nariño para queso fresco), en 2018, 4 brotes de los cuales en uno se involucró queso fresco, en 2019, 3 (uno por queso en Antioquia, uno por arroz chino en Nariño y uno por Mortadela en Medellín). Sin embargo, a pesar de que la legislación colombiana establece que los quesos artesanales no deben de tener *Listeria*, no se hace un monitoreo obligatorio de *L. monocytogenes* en los quesos artesanales, por lo tanto, existe un problema en la notificación de los casos (Ocampo et al., 2019).

*L. monocytogenes* se distribuye ampliamente en el medio ambiente, incluyendo agua, suelo y vegetación. Debido a su amplia distribución, este microorganismo tiene muchas oportunidades para contaminar los alimentos en diferentes pasos en la producción de alimentos. *L. monocytogenes* tiene capacidad para sobrevivir en diferentes condiciones ambientales extremas; por lo tanto, su crecimiento es difícil de controlar en el sistema alimentario (Zhu et al., 2017; Melo, et al., 2015). *L. monocytogenes* puede sobrevivir en amplios rangos de pH (4,0 – 9,5), y temperatura entre 1 y 45°C. Además, puede crecer en presencia de alto contenido de sal, superior al 10% (p/v). Los quesos frescos suaves se caracterizan por un pH entre 4,5 y 6,5; y el contenido de sal entre 2,3 y 3,5% m/m; Además, el microorganismo tiene la capacidad de formar biopelículas, lo que dificulta su erradicación de las líneas de producción (Almeida et al., 2013). La contaminación de los alimentos por *L. monocytogenes* puede ocurrir en cualquier paso de la cadena alimentaria de la granja a la mesa. Los brotes de listeriosis se han detectado en vacas, ovejas y cabras asociadas con el consumo de ensilajes contaminados (Zhu et al., 2017).

Neira y De Silvestri encontraron *L. monocytogenes* en la leche cruda con la cual elaboran el queso Paipa (Neira & de Silvestri, 2006). *L. monocytogenes* puede ser parte de la microbiota de la ubre de vaca, en algunos casos produciendo mastitis clínica o subclínica, causando así la contaminación de la leche en el momento del ordeño y, en consecuencia, produciendo contaminación de derivados lácteos. También puede transmitirse por contaminación cruzada mezclando alimentos crudos y cocidos, y por equipos y utensilios contaminados (WHO, 2020). Para controlar *L. monocytogenes* en el sistema alimentario es necesario mantener un plan de salud animal que monitoree la calidad de los ensilajes consumidos por los animales, monitoree periódicamente enfermedades como la mastitis, tenga orden y limpieza durante todo el proceso, realice un buen manejo de alimentos, implemente adecuadamente un plan de desinfección de equipos, utensilios y superficies.

El queso Paipa es un queso artesanal que madura durante 21 días. Durante la

maduración del queso, muchos microorganismos mueren porque el pH y la actividad del agua disminuyen, y el medio ambiente del queso se vuelve altamente competitivo. Aun así, algunas bacterias patógenas potenciales sobreviven en tales condiciones. Según la FDA, el queso hecho con leche de vaca cruda se debe madurar durante 60 días antes del consumo (FDA, 2016). Algunos autores han indicado que 60 días de maduración son insuficientes para eliminar *L. monocytogenes*, coliformes y *S. aureus* en quesos elaborados con leche cruda (Peng et al., 2013; D'Amico et al., 2008). Fadul y Quecano concluyeron que 30 días de maduración del queso Paipa reducen las poblaciones de *S. aureus* por debajo de los límites permisibles y eliminan *Salmonella* sp. y *Listeria* sp., pero no los coliformes (Fadul & Quecano, 2005). Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en este estudio; el queso Paipa comercializado presentó *Listeria monocytogenes*, coliformes y *S. aureus*, probablemente porque no se respetaron los tiempos de maduración del queso. Los resultados obtenidos mediante técnicas independientes de cultivo indicaron que las poblaciones en los diferentes tiempos de maduración no variaron demasiado, lo cual nos permite deducir que los tiempos utilizados para madurar el queso Paipa son insuficientes para eliminar o disminuir las poblaciones de estos grupos microbianos patógenos. Los productores de queso Paipa argumentan que un tiempo de maduración más largo (>21 días) cambia las propiedades del queso, haciéndolo muy ácido y muy duro, características que tampoco agrada a los consumidores. Por lo tanto, ellos buscan otro tipo de estrategia que pueda mejorar la calidad sanitaria del queso Paipa, sin que se afecte las características sensoriales del producto.

La contaminación de los alimentos con bacterias patógenas como *S. aureus*, coliformes y *L. monocytogenes*, es un problema grave de salud pública, pero puede ser aún más grave si las bacterias son resistentes a los antimicrobianos. El uso indiscriminado de antimicrobianos en seres humanos como en animales destinados al consumo humano y criados con métodos de ganadería intensiva, puede afectar la resistencia a los antibióticos agravando el problema. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconocen que las personas, los animales y el medio ambiente están interconectados; que, en

particular, los alimentos derivados de animales pueden ser una fuente directa de patógenos resistentes (WHO, 2018b; OIE, 2020). Todo ello ha llevado a una gran preocupación por la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en los quesos. Estudios recientes informaron de la presencia de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) en el queso Doble Crema (un queso fresco similar a la mozzarella y otros quesos curados estirados, tradicionalmente elaborados con leche de vaca cruda en pequeñas lecherías en Colombia) (Herrera et al., 2016) y en quesos artesanales de México (Adame-Gómez et al., 2018), Brasil (Gonzalez et al., 2017) y Egipto (Abdel-Hameid et al., 2019), entre otros. Además, los quesos también pueden contener especies de estafilococos coagulasa negativas resistentes a los antimicrobianos y también productoras de enterotoxinas (Alnakip et al., 2019; Bachmann & Spahr, 1995).

Los resultados de este estudio indicaron que *Listeria* sp., aislado del queso Paipa eran sensibles a los antibióticos. Sin embargo, las cepas de *S. aureus* (7%) y coliformes (23,5%) fueron resistentes a la tetraciclina. Esto es probablemente debido al uso inadecuado de antibióticos. Según los productores de queso Paipa, la tetraciclina es el antibiótico más común detectado en la leche. El aumento de patógenos resistentes a los antibióticos en Colombia podría ser por la mala aplicación de buenas prácticas agrícolas en el plan de salud animal. Esta situación no es sólo de Colombia; se ha descrito en otros países con contextos socioeconómicos similares donde la comercialización de antibióticos para uso veterinario no tiene restricciones; por lo que en algunos casos el suministro es empírico y sin la formulación del veterinario, otros utilizan antibióticos como promotores del crecimiento en lugar de utilizarlos para fines terapéuticos (Callejas, 2011).

Los resultados también indicaron que algunas especies de coliformes aisladas del queso Paipa como *Proteus mirabilis* CFQP121, *E. coli* CFA11, *Citrobacter freundii* CFC25 y *Morganella morganii* CFA3 fueron multi-resistentes a los antibióticos (Tabla 10). La resistencia a los antimicrobianos, particularmente en la

familia Enterobacteriaceae, ha alcanzado niveles alarmantes en ciertas partes del mundo. Según la OMS, las bacterias comúnmente notificadas como resistentes a los antibióticos han sido *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. pneumoniae* y *Salmonella* spp.

Los coliformes multi-resistentes se han aislado de varios alimentos (Elbagory et al., 2016; Ombarak et al., 2018). *Citrobacter* spp., *S. marcescens*, y *M. morgani* han sido a menudo resistente a la ampicilina y cefalosporinas debido a la sobreexpresión de un gen inducible ubicado en el cromosoma bacteriano denominado *AmpC-lactam* que codifica para ampC-beta-lactamasas, las cuales confieren resistencia a las cefalosporinas (Tekiner & Özpinar, 2016; Kanamori et al., 2013). *C. freundii* presentó lactamasas de las clases A, B y D en un plásmido multiresistente (Yao et al., 2014). También se ha notificado la aparición de *Enterobacteriaceae* resistentes al carbapenem con metalo-lactamasas (clase B). Estos aislados albergaban un plásmido con elementos móviles que podían transferirse entre la familia *Enterobacteriaceae* (Peter et al., 2014).

Asimismo, el uso de productos para la limpieza y desinfección llamados biocidas, influyen en la resistencia a los antibióticos. Bourtafi y colaboradores aislaron especies de *Enterobacter* resistentes a los antimicrobianos y tolerantes a los biocidas utilizados en los entornos hospitalarios (Boutarfi et al., 2019). Fernández y colaboradores aislaron cepas Gram-positivas que eran tolerantes a un solo biocida, y sólo unos pocos parecían ser multi-tolerantes (Fernández et al., 2017). Según Wesgate y colaboradores, las bacterias tolerantes a los biocidas son más propensas a ser resistentes a los antibióticos, probablemente porque tienen mecanismos de resistencia similares (Boutarfi et al., 2019).

En este estudio, encontramos que las cepas multi-resistentes a los antibióticos no fueron resistentes a los biocidas. Sin embargo, cabe resaltar que las cepas *S. marcescens* CFC11, *C. freundii* cfc2A Rappaport y *Citrobacter freundii* CFA14 fueron tolerantes al triclosán a una concentración de 8 mg/L.

Los biocidas que han presentado mayores valores de tolerancia ha sido la clorhexidina y el triclosán, seguidos de compuestos de amonio cuaternario, resultados que coinciden con este estudio (Lavilla et al., 2013). Arioli y sus colaboradores tampoco encontraron tolerancia sistemática entre dos o más de los biocidas probados en bacterias Gram-positivas (Arioli et al., 2013). Vijayakumar no encontró una correlación significativa entre la presencia o ausencia de genes resistentes a los biocidas y las concentraciones mínimas inhibitorias en cepas multi-resistentes de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Vijayakumar et al., 2018). Beier y sus colaboradores observaron que el 20% de las cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas de la carne de vacuno fueron resistentes a la clorhexidina o al cloruro de benzalkonio (Beier et al., 2013). Además, encontraron resistencia a los antibióticos tetraciclina, estreptomina y cloranfenicol, pero no mostraron correlación entre la tolerancia a biocidas y la resistencia a los antibióticos. La no correlación entre la resistencia a los antibióticos y la tolerancia a los biocidas es posible porque dicha tolerancia está mediada por bombas de exporte con amplia especificidad de sustrato y por cambios en la fluidez de la membrana (Fernández et al., 2017; Beier et al., 2013). Hay estudios que demuestran que la resistencia a los antibióticos viene dada por la exposición sub-inhibidora a los biocidas. Gadea y colaboradores adaptaron cepas de *E. coli* a través de la exposición repetida y un aumento gradual de las concentraciones de triclosán. Los resultados mostraron que las cepas disminuyeron la susceptibilidad a varios agentes antimicrobianos, incluyendo cloranfenicol, eritromicina, imipenem, tetraciclina, trimetoprim, así como una serie de biocidas (Gadea et al., 2016).

Según los resultados obtenidos, el queso Paipa tiene una gran abundancia de bacterias que son un riesgo para la salud, algunas de ellas resistentes a los antibióticos, ello compromete su calidad sanitaria. A nivel mundial, se han estudiado diferentes técnicas para reducir las poblaciones de microorganismos patógenos y alterantes en los alimentos, dentro de ellos se encuentran tratamientos térmicos como la pasteurización y la ultrapasteurización (Silva & Gibbs, 2012), tratamientos no térmicos como altas presiones hidrostáticas (Téllez-Luis et al., 2015; Pérez Pulido et al., 2015), pulsos eléctricos de alta intensidad (Cerón-Castillo et al., 2010),

irradiación (Rossi et al., 2009), compuestos antimicrobianos naturales como el sistema lactoperoxidasa (Seifu et al., 2005), reuterina y diacetilo (Langa et al., 2014), reuteriicina (Gänzle, 2004), lactoferrina (Montiel et al., 2015), lisozima (Ávila et al., 2014) y bacteriocinas (Heng et al., 2007).

Las bacteriocinas son péptidos de origen bacteriano sintetizados ribosómicamente que se caracterizan por presentar un amplio potencial como conservadores de alimentos. Las bacteriocinas que se han estudiado con mayor interés son las producidas por BAL. Muchas de ellas tienen actividad antimicrobiana contra patógenos transmitidos por alimentos que pueden estar en el queso, como *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Heng et al., 2007). Son seguras para su consumo humano porque al llegar al tracto gastrointestinal son inactivadas por proteasas de origen pancreático y gástrico (tripsina y pepsina). Algunas son resistentes al calor, a la acidez y a sustancias químicas como urea, EDTA, Tween 80, NaCl (Favaro et al., 2015; Egan et al., 2016), no alteran las propiedades sensoriales de los alimentos y pueden utilizarse en los alimentos como cultivos iniciadores o como bacteriocina purificada o semi-purificada (Zacharof & Lovitt, 2012). Su actividad se ve potenciada con niveles bajos de pH y pueden llegar a ser más efectivas de manera combinada con otros tratamientos térmicos y no térmicos (Pérez Pulido et al., 2015). Algunas bacteriocinas, también sugieren la posibilidad de mejorar y potenciar las características de los productos de los que han sido aisladas. Se ha determinado que las bacteriocinas pueden ayudar a acelerar el proceso de maduración de los quesos (Favaro et al., 2015). Por lo tanto, el potencial tecnológico de las BAL del queso Paipa mereció una mayor investigación.

A pesar de que predominaron las BAL en la microbiota del queso Paipa, muy pocos aislamientos tuvieron actividad antagónica contra las bacterias patógenas del queso Paipa. Sólo dos BAL de 250 aislamientos mostraron actividad contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Ninguna cepa tuvo actividad frente a los coliformes. Resultados similares fueron obtenidos por González et al. (2007), quienes investigaron la actividad antimicrobiana de 395 cepas aisladas del queso semi-maduro Genestoso, fabricado en Asturias, España. También identificaron ocho cepas

de *L. lactis* subsp. *lactis* que tenía actividad contra *S. aureus*, dos cepas de *E. faecalis* y una de *L. lactis* subsp. *lactis* tenía actividad contra *L. monocytogenes*. Del mismo modo, 58 cepas de *L. mesenteroides* fueron aisladas, y ninguna tuvo actividad contra *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Fuentes-Vanegas et al. (2017) aisló 32 BAL de quesos, de las cuales dos cepas identificadas como *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, mostraron actividad contra *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Los estudios realizados por Attar et al. (2018) indicaron que, en las primeras etapas de la producción de queso, las poblaciones de BAL eran altas, pero luego disminuyeron durante el proceso de maduración. Este fenómeno no fue observado en los estudios independientes de cultivo realizados al queso Paipa. Sin embargo, el bajo número de cepas con actividad antimicrobiana puede ser el resultado de una serie de factores como la baja actividad del agua, los cambios de temperatura y pH, la disponibilidad de nutrientes y la competencia que afectan a la expresión de genes que codifican sustancias antimicrobianas, así como su adsorción en la pared celular de microorganismos (Favaro et al., 2015; de Paula et al., 2015).

La presencia de cepas QP117 y QP63 en el queso Paipa y su capacidad para producir sustancias antimicrobianas se debe a que estas bacterias podrían generar mecanismos de defensa para sobrevivir durante mucho tiempo en condiciones de estrés. Estas bacterias resisten mejor las condiciones de acidez, propiedad que les permite seguir creciendo en las últimas fases de la mayoría de las fermentaciones ácidas-lácticas. Incluso algunos estudios han indicado que las bacterias pueden permanecer durante muchos años en superficies y herramientas utilizadas en la producción de quesos tradicionales formando biopelículas (Galinari et al., 2014; Kubota et al., 2008). Estos resultados fueron corroborados durante esta investigación, pues se observó que las cepas QP63 y QP117 resistieron concentraciones de NaCl del 4%, crecieron en un rango amplio de temperatura (4-42°C) y fueron capaces de soportar ambientes ácidos (>pH 4). En este estudio, el sobrenadante libre de células (SLC) de la cepa QP117, exhibió antagonismo contra todas las *L. monocytogenes* evaluadas, similar al SLC de la cepa de referencia productora de nisina *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454. Los resultados también

indicaron que la cepa QP63 mostró actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* de la colección estadounidense y colombiana. Sin embargo, el efecto del SLC contra *L. monocytogenes* de la colección española fue menor en todos los experimentos realizados (Tabla 11). Las diferencias en la actividad antimicrobiana entre cepas de la misma especie podrían ocurrir porque presentaron resistencia intrínseca o resistencia adquirida (de Freire et al., 2015). Existen varios estudios en los que la resistencia de *L. monocytogenes* está relacionada con la secreción de enzimas y alteraciones en el potencial eléctrico, fluidez, carga y composición de los lípidos de la membrana, dificultando la formación de poros (Kumariya et al., 2019; de Freire et al., 2015; Collins et al., 2012).

Paralelamente, se evaluó el efecto del SLC en cepas de *S. aureus*. Los resultados indicaron que la cepa QP63 y la cepa de referencia *L. lactis* ATCC 11454, mostraron una actividad antimicrobiana similar contra *S. aureus*. Sin embargo, QP117 no mostró tal actividad. Las cepas QP117 y QP63 fueron caracterizadas por pruebas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares. La cepa QP117 presentó características similares a las descritas por de Paula et al. (2015) y Kulwichit et al. (2007), mientras que la cepa QP63 presentó características similares a la cepa de referencia *Lactococcus lactis* ATCC 11454, excepto por la fermentación de sacarosa y la hidrólisis de p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucósido (BGL). Las cepas bacterianas se identificaron molecularmente como *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus lactis* respectivamente. Además de presentar tolerancia a la acidez (pH 4), a la temperatura (42°C) y a altas concentraciones de la (4%), las bacterias presentaron características importantes para la industria alimentaria, como la capacidad de fermentar diversos azúcares como la lactosa, la fructosa, la trehalosa, la maltotriosa. Además, no produjeron  $\beta$  hemólisis en agar de sangre, lo cual sugiere que no son patógenos, característica importante que deben de cumplir para ser utilizados de manera segura como cultivos iniciadores en alimentos.

*L. mesenteroides* y *L. lactis* se han utilizado como cultivo iniciador en varios procesos de fermentación porque mejoran las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de los alimentos y podrían ser útiles en el diseño de nuevos alimentos

funcionales con posibles propiedades probióticas (Bintsis, 2018; Mutukumira et al., 2015; Shin & Han, 2015; Castro et al., 2015; Frece et al., 2014). *L. lactis* tiene un estatus GRAS bien aceptado (Alegría et al., 2010). Sin embargo, *L. mesenteroides* se ha considerado también como un patógeno humano emergente con resistencia natural a la vancomicina (Barletta et al., 2017; Franco-Cendejas et al., 2017; Bou et al., 2008). La prueba de susceptibilidad a antibióticos realizada en la cepa de *L. mesenteroides* QP117 indicó resistencia a la vancomicina, kanamicina, carbenicilina, oxacilina, estreptomina y levofloxacina. Estudios realizados por de Paula et al. (2014) revelaron que *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 contienen genes que codifican factores de virulencia como la proteína de superficie enterocócica (*esp*), la proteína de adhesión al colágeno (*ace*) y el gen de resistencia a la vancomicina (*vanA*). Por lo tanto, si desea utilizar esta cepa para mejorar la calidad del queso Paipa, se debe determinar la presencia de posibles genes de virulencia a través de un enfoque molecular.

Luego de realizar la selección de las cepas, se realizó una curva de crecimiento para saber en qué tiempo se producía la mayor cantidad de sustancia antimicrobiana, con el fin de posteriormente realizar su purificación. *L. mesenteroides* QP117 y *L. lactis* QP63 produjeron las sustancias antimicrobianas de manera extracelular durante la fase logarítmica. La cepa QP117 produjo su mayor actividad a las 16 h de fermentación mientras que QP63 lo logró a las 24 h. La producción de las bacteriocinas tiene una relación directamente proporcional con el crecimiento bacteriano e inversamente proporcional a la acidez en el medio de cultivo, lo cual concuerda con lo descrito por Martínez et al. (2019). También se observó que las sustancias antimicrobianas no pierden su actividad, por el contrario, se mantiene en el tiempo. Estos resultados sugieren que las sustancias antimicrobianas son estables a factores fisicoquímicos y no son degradadas por la cepa productora. Luego de realizar la determinación de los tiempos donde se produce la mayor actividad de la sustancia antibacteriana, se realizó un escalamiento del proceso de fermentación hasta alcanzar un volumen final de 10 L con el fin de realizar su purificación parcial. Los resultados indicaron que las sustancias antimicrobianas aumentaron su actividad anti-*Listeria*, siendo superior a la obtenida

con los sobrenadantes libres de células y a la nisina a una concentración de 6 mg/L, resultados que coinciden con lo reportado (Lee et al., 1999).

Las sustancias antimicrobianas parcialmente purificadas también se evaluaron contra otras cepas bacterianas. Los resultados indicaron que *L. lactis* QP63 presentó actividad frente *E. faecalis* ATCC 51299, *E. faecium* ATCC 33667, *L. casei* ATCC 393, *L. mesenteroides* QP117 y *L. lactis* ATCC 11454. Sin embargo, no tuvo actividad contra *S. aureus*, *S. saprophyticus* ATCC 49907, *B. thuringiensis* ATCC 33679, *B. cereus* ATCC 11778 y *S. agalactiae* ATCC 12386. Estos resultados coincidieron parcialmente con lo descrito por Egan et al. (2016), quienes reportaron que *L. lactis* inhibía a *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Micrococcus* y diferentes bacterias esporuladas como *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *Clostridium butyricum* y *C. tyrobutyricum*. Eso podría ser posible porque *L. lactis* puede producir diferentes bacteriocinas como nisina, lacticina y lactococcina (Ribeiro et al., 2016; Alegría et al., 2010).

Para determinar el tipo de bacteriocina se determinó la naturaleza de los compuestos antimicrobianos. Los resultados indicaron que son péptidos termoestables y acidotolerantes que no pierden su actividad en presencia de agentes químicos como EDTA, urea, SDS y Tween, resultados que concuerdan con los obtenidos por Kaktcham et al. (2019). A diferencia de la nisina, las sustancias antimicrobianas producidas por la cepa QP63, no pierden su actividad a pH 12. La resistencia de estos compuestos podría atribuirse a los enlaces intramoleculares monosulfuro y disulfuro, que mantiene estable la estructura secundaria mediante la reducción de las posibles estructuras desplegadas (Oscáriz & Pisabarro, 2001). Posteriormente se determinó la relación masa/carga de las sustancias antimicrobianas. Los espectros obtenidos por MALDI-TOF indicaron que las sustancias antimicrobianas son péptidos de bajo peso molecular (relación masa/carga <6). El espectro de acción de las sustancias antimicrobianas, su fuerte actividad antilisteria, sumado a la termotolerancia y acidotolerancia y a su relación masa/carga indicaron que se trató de bacteriocinas de la familia de los lantióticos (clase I o II).

Estas bacteriocinas son las más extensamente estudiadas y caracterizadas (García-Cayuela et al., 2017; Ennahar et al., 1999). Al comparar los espectros de *L. lactis* QP63 con la nisina comercial, se observó que fueron muy diferentes. La nisina presentó tres picos específicos, uno de 3365,8 masa/carga, el cual como era de esperar está dentro del rango de masas para las diferentes variantes de la nisina (3327–3354 masa/carga) (García-Cayuela et al., 2017). El análisis MALDI-TOF de las fracciones semipurificadas por cromatografía de intercambio iónico de *L. lactis* cepa QP63, permitió la identificación de tres picos específicos (1299,818, 1947,235 y 5938,94 masa/carga). Ninguno de ellos coincidió con los de la nisina comercial. En este sentido, se llevó a cabo una búsqueda de literatura y en la base de datos (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php>) de los valores masa/carga de *L. lactis* QP63. No se encontraron similitudes con bacteriocinas producidas por *L. lactis*. La nisina A tuvo un peso molecular de 3516,78 Da, la nisina Z de 3493,74 Da, la nisina Q de 3489,73 Da, la nisina F de 3479,71 Da y la nisina U, tuvo un peso molecular de 3192,37 Da. Por lo anterior los resultados junto con su reducido espectro antimicrobiano, sugieren que los péptidos antimicrobianos producidos por *L. lactis* QP63 no corresponde a la nisina.

De otro lado, se hizo el mismo análisis con las bacteriocinas lacticinas y lactococinas. Ninguna de las relaciones masa/carga coincidieron de forma precisa con lo descrito en la base de datos. Sin embargo, las lacticinas que tuvieron una relación masa/carga más cercana fueron lacticina Z (5959,09) y lacticina Q (5917,05). Al mirar todo el contexto, la identidad de la cepa productora, el espectro de inhibición, acidotolerancia, termoresistencia, la estabilidad de su actividad a un pH de 12, la no afectación por sustancias químicas y la relación masa carga, consideramos que la bacteriocina producida por *L. lactis* QP63 pertenece al grupo de las lacticinas. Sin embargo, se requieren hacer un análisis mucho más profundo que involucre la amplificación de genes específicos de lacticinas y la secuenciación de aminoácidos, para poder identificar la bacteriocina completamente.

De otro lado, *L. mesenteroides* presentó un espectro de acción inhibitorio un poco más amplio. Además de presentar actividad contra *E. faecalis* ATCC 51299,

*E. faecium* ATCC 33667, *L. casei* ATCC 393, *L. mesenteroides* QP117 y *L. lactis* ATCC 11454, presentó actividad contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Clostridium perfringens* ATCC 13124. Sin embargo, cabe resaltar que no presentó actividad contra *S. aureus*, *S. saprophyticus* ATCC 49907, *B. thuringiensis* ATCC 33679, *B. cereus* ATCC 11778 y *S. agalactiae* ATCC 12386. Las sustancias antimicrobianas producidas por *L. mesenteroides* QP117 también fueron péptidos termoestables y acidotolerantes que no pierden su actividad en presencia de agentes químicos como EDTA, urea, SDS y Tween. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por diferentes investigadores (Chen et al., 2018; Shin & Han, 2015; de Paula et al., 2015; Arakawa et al., 2016). El análisis mediante MALDI-TOF de las fracciones semipurificadas por cromatografía de intercambio iónico de *L. mesenteroides* cepa QP117, permitió la identificación de tres picos específicos (1284,277, 2027,756 y 3497,558 masa/carga). En este sentido, se llevó a cabo una búsqueda de literatura de los valores masa/carga de las bacteriocinas producidas por *L. mesenteroides*. Se determinó que las mesenterocinas y leucocinas son las bacteriocinas producidas por *L. mesenteroides* (Chen et al., 2018; Shin & Han, 2015; de Paula et al., 2015). Al comparar los picos específicos con los reportados por la base de datos (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php>), se determinó que el pico (3497,558 masa/carga) es muy similar al pico de *Leuconostoc mesenteroides* (3484,5 masa/carga) productor de una bacteriocina denominada Leucocina B (Papathanasopoulos et al., 1998). La fuerte actividad antilisteria de las sustancias antimicrobianas, su carácter proteico, acidotolerancia, termotolerancia y su relación masa/carga indicaron que podría tratarse de una Leucocina. No obstante, el siguiente paso de esta investigación sería realizar amplificación de genes específicos de leucocinas y la secuenciación de aminoácidos, para poder identificar la bacteriocina de una manera completa.

Algunos autores sugieren que utilizar una cepa productora de bacteriocinas puede no ser suficiente para generar la protección de los alimentos (Mills et al., 2017). La actividad de la bacteriocina podría aumentarse si se agregan varias cepas que actúen sinérgicamente como cultivos iniciadores y/o protectores (Coelho et al., 2014). En este estudio se evaluó la actividad de los eluidos cromatográficos entre las

cepas BALs seleccionadas. Los resultados indicaron que las cepas fueron inhibidas entre sí, por lo que no pueden utilizarse en combinación para realizar un tratamiento que mejore la calidad microbiológica del queso. Ellas también fueron inhibidas por la nisina a concentraciones 6 and 12 mg/L. Coelho et al. (2014) hicieron diferentes combinaciones de BAL para controlar *L. monocytogenes* en queso fresco. Concluyeron que los consorcios de *E. faecalis* disminuyeron la población de *L. monocytogenes* en cinco unidades logarítmicas. Mills et al. (2017) desarrolló un cultivo iniciador grado commercial denominada *L. lactis* CSK3533, capaz de producir nisina y lacticina 3147, que es inmune a la bacteriocinas. También evaluaron el potencial anti-listeria de la cepa CSK3533 solo y en combinación con la cepa también productora de bacteriocina *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358. Sus resultados indicaron que la combinación de estas cepas fue más eficaz en el control de *Listeria* sp., en quesos. Otra estrategia para mejorar el uso de bacteriocinas es utilizar combinaciones de bacteriocinas puras o parcialmente purificadas. Bouttefroy & Millière (2000) concluyeron que la combinación de nisina y curvaticina 13 (subclase IIa) es mejor contra *L. monocytogenes* que las bacteriocinas solas. Kaur et al. (2013) determinaron que la combinación de nisina, pediocina 34 y enterocina FH99 disminuyó las poblaciones de *L. monocytogenes*. Asimismo, Arqués et al. (2008) determinó que la combinación de lactoperoxidasa, nisina e enterocina AS-48 redujo las poblaciones de *L. monocytogenes* en leche en ocho unidades logarítmicas. Por otro lado, Chi & Holo (2018) mostraron que la combinación de garvicina K y nisina actuaron sinérgicamente contra *S. aureus*. Pimentel-Filho et al. (2014) encontraron que la combinación de nisina y bovicin HC5 disminuyó las poblaciones de *L. monocytogenes* y *S. aureus* en queso fresco. La combinación de bacterias puras o semi-purificadas de las cepas seleccionadas en este estudio podría tener un efecto significativo en los patógenos presentes en el queso Paipa.

Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que los BAL aislados del queso Paipa y la nisina no mostraron actividad contra coliformes (Tabla 1). Estos resultados coinciden con el descrito por varios investigadores donde se informa que las sustancias antimicrobianas producidas por bacterias Gram-positivas tienen un espectro de inhibición reducido, especialmente contra las bacterias Gram-negativas

(Schirru et al., 2012). Las bacteriocinas podrían aumentar su eficacia contra las bacterias Gram-negativas cuando se combinan con tecnologías emergentes. Branen & Davidson (2004) determinaron que la combinación de nisina y EDTA disminuye las poblaciones de *E. coli* enterohemorrágica. Chi & Holo (2018) evidenciaron que la combinación de garvicina KS, nisin y farnesol, inhibió el crecimiento de *E. coli* y *Acinetobacter* spp. Rodríguez et al. (2005) determinaron que una presión hidrostática de 500 MPa a 10°C durante 5 minutos con inoculación de bacteriocinas productoras de BAL son suficientes para inhibir la población de *E. coli* O157:H7 en cinco unidades logarítmicas en quesos maduros durante 60 días. Kavas et al. (2015) determinaron que los aceites esenciales de tomillo y clavo de olor al 1,5% (v/v) aplicados en el envasado de queso Kashar disminuyeron las poblaciones de *E. coli*. Mirhosseini & Afzali (2016) determinaron que la combinación de nanopartículas de óxido de magnesio (MgO NP), con nisina, tenía un efecto antibacteriano sinérgico contra *E. coli* en la leche. Es posible que las cepas BAL aisladas y caracterizadas en este estudio, o sus bacteriocinas purificadas o parcialmente purificadas, combinadas con algunas de estas tecnologías emergentes en la conservación de alimentos, puedan mejorar la calidad sanitaria del queso Paipa, especialmente para el control de los coliformes.

## **VIII.- CONCLUSIONES**

- Los resultados del presente estudio revelaron que la microbiota central de los quesos Paipa no sólo incluye bacterias del ácido láctico, sino también bacterias alterantes, potencialmente productores de enterotoxinas y patógenos humanos, lo que sugiere la necesidad de una mejora o refuerzo en las regulaciones para la producción de queso Paipa tradicional.
- Las diferencias en la composición microbiana de los quesos encontrados sugieren que la microbiota residente y las diferentes prácticas de higiene contribuyen a la microbiota final de los quesos.
- Los quesos Paipa de empresas formales e informales no cumplen con los límites permisibles de *S. aureus*, coliformes y *L. monocytogenes* contemplados en la normatividad nacional. Estos resultados podrían ser una indicación de los riesgos para la salud asociados con el consumo de queso Paipa.
- En este estudio se pudo comprobar que hay pocas cepas multi-resistentes a antimicrobianos y susceptibles a los biocidas, lo cual da una parte de la tranquilidad a los consumidores y a la comunidad en general. Sin embargo, tenemos que estar alerta. Creemos que los estudios futuros deben centrarse en mejorar la calidad higiénica de la leche con la que se elabora el queso Paipa. Los procedimientos de limpieza y desinfección en las microempresas del queso Paipa deben estar estandarizados, empezando por el lavado de manos, la limpieza del lugar de trabajo, la desinfección de equipos y superficies teniendo en cuenta la rotación y dosificación de los biocidas con el objetivo final de controlar la resistencia bacteriana. Se deben implementar muestreos para controlar los patógenos y tomar medidas correctivas para reducir la contaminación microbiana y la resistencia a los antibióticos y biocidas.
- Las bacterias del ácido láctico son el principal grupo bacteriano de los quesos Paipa y eso es lo que hay que potenciar. En este estudio se pudo aislar y caracterizar

dos BAL productoras de bacteriocinas *L. lactis* QP63 y *L. mesenteroides* QP117. Ambas cepas presentan características prometedoras para poder ser utilizadas como cultivos iniciadores en la fabricación del queso Paipa. *L. lactis* QP63 produjo una bacteriocina con características similares al grupo de las lacticinas, mientras que *L. mesenteroides* QP117 produjo una bacteriocina con características similares a las del grupo de las leucocinas. Sin embargo, se debe realizar una caracterización más profunda, como la detección de genes productores de lacticina y leucocina y la secuenciación de aminoácidos para su identificación completa.

- Se deben seguir haciendo investigaciones para mejorar la calidad sanitaria del queso, como la evaluación de cultivos protectores, cultivos iniciadores y el uso de bacteriocinas solas o combinadas con otras técnicas como bacteriófagos y nanopartículas. Todas estas medidas contribuirán a aumentar la confianza entre los consumidores que generan más empleo y más ingresos y a mejorar la calidad de vida de los productores, vendedores y consumidores.

## **IX.- REFERENCIAS**

- ABC Gastronomía. (2020). Estos son los 26 quesos españoles con Denominación de Origen. Retrieved July 14, 2020, from [https://www.abc.es/viajar/gastronomia/abci-estos-26-quesos-espanoles-denominacion-origen-202001200137\\_noticia.html](https://www.abc.es/viajar/gastronomia/abci-estos-26-quesos-espanoles-denominacion-origen-202001200137_noticia.html)
- Abdel-Hameid Ahmed, A., Saad Maharik, N. M., Valero, A., & Kamal, S. M. (2019). Incidence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in milk and Egyptian artisanal dairy products. *Food Control*, *104*, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.017>
- Abriouel, H. (2003). A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *Journal of Microbiological Methods*, *55*(3), 599–605. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00202-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00202-1)
- Adame-Gómez, R., Toribio-Jiménez, J., Vences-Velázquez, A., Rodríguez-Bataz, E., Santiago Dionisio, M. C., & Ramírez-Peralta, A. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in artisanal cheeses in México. *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2018/8760357>
- Addis, E., Fleet, G. H., Cox, J. M., Kolak, D., & Leung, T. (2001). The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. In *International Journal of Food Microbiology*, *69*, 25–36. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00569-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00569-4)
- Ahmed, N. I., A Abd El Aal, S. F., Ayoub, M. A., El Sayed, M. S., & Fathy Ahmed Abd El Aal, S. (2014). Enumeration and characterization of *Aeromonas* spp. isolated from milk and some dairy products in Sharkia governorate Egypt. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences* (Vol. 40). Retrieved from [www.alexjvs.com](http://www.alexjvs.com)
- Aldrete-Tapia, A., Escobar-Ramírez, M. C., Tamplin, M. L., & Hernández-Iturriaga, M. (2014). High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiology*, *44*, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.022>
- Alegría, Á., Delgado, S., Roces, C., López, B., & Mayo, B. (2010). Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, *143*(1–2), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.029>
- Alegría, Á., Delgado, S., Roces, C., López, B., Mayo, B., González, L., ... Georgescu, D. (2015). Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *Food Control*, *1*(6), 716–722. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Alkan, C., Sajjadian, S., & Eichler, E. E. (2011, January 21). Limitations of next-generation genome sequence assembly. *Nature Methods*. Nature Publishing Group.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.1527>

- Almeida, G., Magalhães, R., Carneiro, L., Santos, I., Silva, J., Ferreira, V., ... Teixeira, P. (2013). Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.006>
- Alnakip, M. E., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Caamaño-Antelo, S., Bayoumi, M. A., Kamal, R. M., ... Barros-Velázquez, J. (2019). Molecular characterisation and typing the methicillin resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from raw milk and cheeses in northwest Spain: A mini survey. *International Dairy Journal*, 89, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.09.006>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alzohairy, A. M. (1991). BioEdit: An important software for molecular biology Software Review. Retrieved from <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>
- Ananou, S., Muñoz, A., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2008). Optimization of enterocin AS-48 production on a whey-based substrate. *International Dairy Journal*, 18(9), 923–927. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.02.001>
- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), & WEF (Water Environment Federation) (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater. (22d edition)*. Washington, D.C.: American Public Health Association. Retrieved from <https://www.wef.org/resources/publications/books/StandardMethods/>
- Arakawa, K., Yoshida, S., Aikawa, H., Hano, C., Bolormaa, T., Burenjargal, S., & Miyamoto, T. (2016). Production of a bacteriocin-like inhibitory substance by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 213M0 isolated from Mongolian fermented mare milk, airag. *Animal Science Journal*, 87(3), 449–456. <https://doi.org/10.1111/asj.12445>
- Argemi, X., Hansmann, Y., Prola, K., & Prévost, G. (2019). Coagulase-Negative *Staphylococci* Pathogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1215. <https://doi.org/10.3390/ijms20051215>
- Arioli, S., Elli, M., Ricci, G., & Mora, D. (2013). Assessment of the susceptibility of lactic acid bacteria to biocides. *International Journal of Food Microbiology*, 163(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.002>
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Nuñez, M., & Medina, M. (2008). Antimicrobial activity of nisin, reuterin, and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cuajada, a semisolid dairy product manufactured in Spain. *Journal of Dairy Science*, 91(1),

- 70–75. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0133>
- Attar, M. A., Yavarmanesh, M., Mortazavi, A., Edalatian Dovom, M. R., & Habibi Najafi, M. B. (2018). Antibacterial effects of *Lactococcus lactis* isolated from Lighvan cheese regarding the recognition of Nisin, Lacticin and Lactococcin structural genes. *LWT - Food Science and Technology*, *89*, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.044>
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Hernández, M., & Garde, S. (2014). Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. *International Journal of Food Microbiology*, *172*, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.002>
- Bachmann, H. P., & Spahr, U. (1995). The fate of potentially pathogenic bacteria in swiss hard and semihard cheeses made from raw milk. *Journal of Dairy Science*, *78*(3), 476–483. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76657-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76657-7)
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Koraichi Ibnsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71-79 <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F., & Tabanelli, G. (2019). Biogenic amine production by lactic acid bacteria: A Review. *Foods*, *8*(1), 17. <https://doi.org/10.3390/foods8010017>
- Barletta, J., Estrada, T., Rolón, M. J., Erbin, M., Sara, K., & Pérez, H. (2017). Meningitis due to *Leuconostoc Mesenteroides* associated with central nervous system tuberculosis: a case report. *Annals of Clinical Case Reports*, *2*, 1–2. Retrieved from <http://anncaserep.com/>
- Baruzzi, F., Lagonigro, R., Quintieri, L., Morea, M., & Caputo, L. (2012). Occurrence of non-lactic acid bacteria populations involved in protein hydrolysis of cold-stored high moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiology*, *30*(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.009>
- BBL™ Crystal™ Identification. (2020). BBL™ Crystal™ Identification Systems Rapid Gram-Positive ID Kit for Export Use Only. Retrieved July 14, 2020 [https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8809711JAA\(02\).pdf](https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8809711JAA(02).pdf)
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice*, *98*, 236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Beier, R. C., Poole, T. L., Brichta-Harhay, D. M., Anderson, R. C., Bischoff, K. M., Hernandez, C. A., ... Nisbet, D. J. (2013). Disinfectant and antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* O157: H7 strains from cattle carcasses, feces, and hides and ground beef from the united states. *Journal of Food Protection*, *76*(1), 6–17. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-253>
- Bellio, A., Chiesa, F., Gallina, S., Bianchi, D. M., Macori, G., Bossi, D., ... Decastelli, L. (2019).

- Insight into the distribution of staphylococci and their enterotoxins in cheeses under natural conditions. *Frontiers in Microbiology*, 9(JAN), 3233. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03233>
- Beltrán, M., & Castellanos-Rozo, J. (2016). *Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología Ambiental / Universidad de Boyacá*. (U. de Boyacá, Ed.) (1st ed.). Tunja, Boyacá.
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, 4(4), 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
- Bogsan, C. S., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2015). From traditional knowledge to an innovative approach for bio-preservation in food by using lactic acid bacteria (pp. 1–36). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-23177-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23177-8_1)
- Bokulich, N. A., & Mills, D. A. (2013). Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5214–5223. <https://doi.org/10.1128/AEM.00934-13>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Bou, G., Saleta, J. L., Nieto, J. A. S., Tomás, M., Valdezate, S., Sousa, D., ... Llinares, P. (2008). Nosocomial outbreaks caused by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. *Emerging Infectious Diseases*, 14(6), 968–971. <https://doi.org/10.3201/eid1406.070581>
- Boutarfi, Z., Rebiahi, S. A., Morghad, T., Perez Pulido, R., Grande Burgos, M. J., Mahdi, F., ... Galvez, A. (2019). Biocide tolerance and antibiotic resistance of *Enterobacter* spp. isolated from an Algerian hospital environment. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 18, 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.04.005>
- Bouttefroy, A., & Millière, J. B. (2000). Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1–2), 65–75. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00372-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00372-X)
- Branen, J. K., & Davidson, P. M. (2004). Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), 63–74. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00172-7)
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Callejas, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 30(6), 519–528. Retrieved from

- <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/9428/a04v30n6.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Carafa, I., Stocco, G., Nardin, T., Larcher, R., Bittante, G., Tuohy, K., & Franciosi, E. (2019). Production of naturally  $\gamma$ -aminobutyric acid-enriched cheese using the dairy strains *Streptococcus thermophilus* 84C and *Lactobacillus brevis* DSM 32386. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 93. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00093>
- Castro Rodríguez, D., Hernández, H., Sánchez, J., & Fernández, Y. (2015). Probiotic Properties of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Aguamiel of *Agave salmiana*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(2), 107–117. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9187-5>
- Cereser, N. D., Rossi Junior, O. D., Martineli, T. M., Souza, V., Rodrigues, L. B., & Cardozo, M. V. (2013). *Aeromonas* in processing line of minas frescal and colonial cheeses/*Aeromonas* no processamento de queijos tipos minas frescal e colonial. *Ars Veterinaria*, 29(1), 23. <https://doi.org/10.15361/2175-0106.2013v29n1p23-29>
- Cerón-Castillo, T. ., Palou, E., & López-Malo, A. (2010). Pulsos eléctricos: fundamentos y aplicaciones en los alimentos. Retrieved July 17, 2020, from [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-1/TSIA-4\(1\)-Ceron-Carrillo-et-al-2010.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-1/TSIA-4(1)-Ceron-Carrillo-et-al-2010.pdf)
- Chandrasekar, V., Knabel, S. J., & Anantheswaran, R. C. (2015). Modeling development of inhibition zones in an agar diffusion bioassay. *Food Science and Nutrition*, 3(5), 394–403. <https://doi.org/10.1002/fsn3.232>
- Chang, S.-Y., Chen, Y.-S., Pan, S.-F., Lee, Y.-S., Chang, C.-H., Chang, C.-H., ... Wu, H.-C. (2013). Enterocin TW21, a novel bacteriocin from *dochi* -isolated *Enterococcus faecium* D 081821. *Journal of Applied Microbiology*, 115(3), 673–678. <https://doi.org/10.1111/jam.12265>
- Chaves-Lopez, C., De Angelis, M., Martuscelli, M., Serio, A., Paparella, A., & Suzzi, G. (2006). Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *Journal of Applied Microbiology*, 101(2), 353–360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02941.x>
- Cheigh, C. I., & Pyun, Y. R. (2005). Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnology Letters*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-2721-x>
- Chen, Y. sheng, Wu, H. chung, Kuo, C. yu, Chen, Y. wei, Ho, S., & Yanagida, F. (2018). Leucocin C-607, a Novel Bacteriocin from the Multiple-Bacteriocin-Producing *Leuconostoc pseudomesenteroides* 607 Isolated from Persimmon. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*,

- 10(2), 148–156. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9359-6>
- Chi, H., & Holo, H. (2018). Synergistic antimicrobial activity between the broad spectrum bacteriocin garvicin ks and nisin, farnesol and polymyxin b against gram-positive and gram-negative bacteria. *Current Microbiology*, 75(3), 272–277. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1375-y>
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F., & Hernández, P. E. (2001). Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*, 7(4), 281–305. <https://doi.org/10.1106/R8DE-P6HU-CLXP-5RYT>
- CLSI. Clinical & Laboratory Standards Institute. (2019). EM100 connect - CLSI m100 ed29:2019. retrieved july 16, 2020, from [http://em100.edaptivedocs.net/getdoc.aspx?doc=clsi\\_m100\\_ed29:2019&sbssok=clsi\\_m100\\_ed29:2019\\_section\\_clsi\\_reference\\_methods\\_vs\\_commercial\\_methods\\_and\\_clsi\\_vs\\_us\\_food\\_and\\_drug\\_administration\\_breakpoints\\_\[next\]](http://em100.edaptivedocs.net/getdoc.aspx?doc=clsi_m100_ed29:2019&sbssok=clsi_m100_ed29:2019_section_clsi_reference_methods_vs_commercial_methods_and_clsi_vs_us_food_and_drug_administration_breakpoints_[next])
- Coelho, M. C., Silva, C. C. G., Ribeiro, S. C., Dapkevicius, M. L. N. E., & Rosa, H. J. D. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.029>
- Collins, B., Guinane, C. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Paul Ross, R. (2012). Assessing the contributions of the lias histidine kinase to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, cephalosporins, and disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2923–2929. <https://doi.org/10.1128/AEM.07402-11>
- Consejo de la Unión Europea. (2006). EUR-Lex - 32006R0510 - EN - EUR-Lex. Retrieved July 14, 2020, from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/es/ALL/?uri=CELEX%3A32006R0510>
- Contextoganadero. (2016). Colombia, a la vanguardia en producción de quesos: informe | Contexto Ganadero. *Contexto Ganadero*. Retrieved from <http://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/colombia-la-vanguardia-en-produccion-de-quesos-informe>
- Cornejo-Romero, A., Serrato Díaz, A., Rendón Aguilar, B., & Rocha Munive, M. G. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos (1st ed.). México, D.F. Retrieved from [http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4\\_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcología.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcología.pdf)
- Cousin, M. A. (1982). Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review1. *Journal of Food Protection*, 45(2), 172–207. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-45.2.172>
- D’Amico, D. J., Druart, M. J., & Donnelly, C. W. (2008). 60-day aging requirement does not ensure safety of surface-mold-ripened soft cheeses manufactured from raw or pasteurized milk when *Listeria monocytogenes* is introduced as a postprocessing contaminant. *Journal of Food*

- Protection*, 71(8), 1563–1571. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.8.1563>
- da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., & Oliveira, R. P. de S. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 527–536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.041>
- Dalmasso, A., Soto del Rio, M. de los D., Civera, T., Pattono, D., Cardazzo, B., & Bottero, M. T. (2016). Characterization of microbiota in Plaisentif cheese by high-throughput sequencing. *LWT - Food Science and Technology*, 69(69), 490–496. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.004>
- de Freire Bastos, M. D. C., Varella Coelho, M. L., & da Silva Santos, O. C. (2015). Resistance to bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology (United Kingdom)*, 161(4), 683–700. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082289-0>
- de Kraker, M. E. A., Stewardson, A. J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? *PLOS Medicine*, 13(11), e1002184. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>
- De Kwaadsteniet, M., Ten Doeschate, K., & Dicks, L. M. T. (2008). Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*). *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 547–549. <https://doi.org/10.1128/AEM.01862-07>
- de Paula, A. T., Jeronymo-Ceneviva, A. B., Silva, L. F., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. M., & Penna, A. L. B. (2015). *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Annals of Microbiology*, 65(2), 899–910. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0933-9>
- Delgado, S., Fracchetti, F., Mayo, B., & Torriani, S. (2011). Development and validation of a multiplex PCR-based DNA microarray hybridisation method for detecting bacterial antibiotic resistance genes in cheese, 21, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.10.005>
- Dhanashekar, R., Akkinapalli, S., & Nellutla, A. (2012). Milk-borne infections an analysis of their potential effect on the milk industry. *GERMS*. <https://doi.org/10.11599/germs.2012.1020>
- Dugat-Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou, A. S., Bonnarme, P., & Irlinger, F. (2016). Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026>
- Egan, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., & Cotter, P. D. (2016, April 8). Bacteriocins: Novel solutions to age old spore-related problems? *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00461>
- Elbagory, A., Hammad, A. M., & Alzahraa, S. M. (2016). Prevalence of coliforms, antibiotic resistant coliforms and e. coli serotypes in raw milk and some varieties of raw milk cheese in Egypt.

<https://doi.org/10.16966/2470-6086.114>

- Ennahar, S., & Deschamps, N. (2000). Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 449–457. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00985.x>
- Ennahar, S., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (1999). Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: Antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(6), 705–716. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80142-X](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80142-X)
- European Parliament and Council. (2012). Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. Official Journal of the European Union. Retrieved July 14, 2020, <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2012/528/oj>
- Fadul Pacheco, L., & Quecano Poveda, M. (2005). Evaluación de la flora microbiana del queso Paipa durante diferentes periodos de maduración. Universidad de la Salle. <https://doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201>
- Falardeau, J., Keeney, K., Trmčić, A., Kitts, D., & Wang, S. (2019). Farm-to-fork profiling of bacterial communities associated with an artisan cheese production facility. *Food Microbiology*, 83, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.002>
- FAO. Food and Agriculture Organization. (2006). Codex Alimentarius. Retrieved July 14, 2020, from [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B283-1978%252FCXS\\_283s.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B283-1978%252FCXS_283s.pdf)
- FAO. Food and Agriculture Organization (2020). Producción y productos lácteos: Tipos y características. Retrieved July 14, 2020, from <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/tipos-y-caracteristicas/es/>
- Favaro, L., Barretto Penna, A. L., & Todorov, S. D. (2015). Bacteriocinogenic LAB from cheeses – application in biopreservation? *Trends in Food Science & Technology*, 41(1), 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.001>
- FDA. U.S. Food and Drug Administration (2016). FY 2014 – 2016 Microbiological Sampling Assignment Summary Report: Raw Milk Cheese Aged 60 Days. Retrieved from <https://www.fda.gov/media/99340/download#:~:text=Evidence%20indicates%20that%20a%20raw,a%20potential%20hazard%20to%20consumers.&text=made%20from%20raw%20milk%20was,illness%20from%201993%20to%202006.>
- Fernández Martínez B. (1996). Aislados De Quesos Asturianos: Nisina Z Y Lactococina 972.

Retrieved from <http://digital.csic.es/bitstream/10261/8416/1/bea%20tesis.pdf>

- Fernández Márquez, M. L., Grande Burgos, M. J., López Aguayo, M. C., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., & Lucas, R. (2017). Characterization of biocide-tolerant bacteria isolated from cheese and dairy small-medium enterprises. *Food Microbiology*, *62*, 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.008>
- Field, D., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2015). Bioengineering of the model lantibiotic nisin. *Bioengineered*, *6*(4), 187–192. <https://doi.org/10.1080/21655979.2015.1049781>
- Fisher, E. L., Otto, M., & Cheung, G. Y. C. (2018, March 1). Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00436>
- Franco-Cendejas, R., Colín-Castro, C. A., Hernández-Durán, M., López-Jácome, L. E., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., ... Acosta-Rodríguez, E. (2017). *Leuconostoc mesenteroides* periprosthetic knee infection, an unusual fastidious Gram-positive bacterium: A case report. *BMC Infectious Diseases*, *17*(1), 227. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2315-y>
- Fratamico, P. M., DeRoy, C., Liu, Y., Needleman, D. S., Baranzoni, G. M., & Feng, P. (2016). Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *7*(MAY), 644. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00644>
- Frece, J., Cvrtila, J., Topič, I., Delaš, F., & Markov, K. (2014). *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as potential functional starter culture. *Food Technology and Biotechnology*, *52*(4), 489–494. <https://doi.org/10.17113/ftb.52.04.14.3794>
- Freitas, A. C., Nunes, M. P., Milhomem, A. M., & Ricciardi, I. D. (1993). Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection*, *56*(1), 62–65. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-56.1.62>
- Frétin, M., Martin, B., Rifa, E., Isabelle, V. M., Pomiès, D., Ferlay, A., ... Delbès, C. (2018). Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses is influenced by grazing systems. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18447-y>
- Fuentes Vanegas, M. A., Londoño Zapata, A. F., Durango Zuleta, M. M., Gutiérrez Butiricá, M. A., Ochoa Agudelo, S., & Sepúlveda Valencia, J. U. (2017). Capacidad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas autóctonas aisladas de queso doble crema y quesillo colombiano - Dialnet. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *15*(1), 45–55. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6117759>
- Fujita, K., Ichimasa, S., Zendo, T., Koga, S., Yoneyama, F., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2007). Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of gram-positive bacteria. *Applied and Environmental*

- Microbiology*, 73(9), 2871–2877. <https://doi.org/10.1128/AEM.02286-06>
- Gadea, R., Fernández Fuentes, M. Á., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., & Ortega, E. (2016). Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: Effects on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses. *Food Research International*, 85, 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.033>
- Gaglio, R., Couto, N., Marques, C., de Fatima Silva Lopes, M., Moschetti, G., Pomba, C., & Settanni, L. (2016). Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.020>
- Galinari, É., Escarião Da Nóbrega, J., José De Andrade, N., Lúcia De Luces, C., & Ferreira, F. (2014). Microbiological aspects of the biofilm on wooden utensils used to make a Brazilian artisanal cheese. Retrieved from [www.sbmicrobiologia.org.br](http://www.sbmicrobiologia.org.br)
- Gallegos, J. G., Arrieta, G., Máttar, S., Poutou, R., Trespalacios, A., & Carrascal, A. (2007). Frecuencia de *Listeria* spp., en quesos colombianos costeños. *Revista MVZ Córdoba*. <https://doi.org/10.21897/rmvz.420>
- Gänzle, M. G. (2004). Reutericyclin: Biological activity, mode of action, and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- García-Cayuela, T., Requena, T., Martínez-Cuesta, M. C., & Peláez, C. (2017). Rapid detection of *Lactococcus lactis* isolates producing the lantibiotics nisin, lacticin 481 and lacticin 3147 using MALDI-TOF MS. *Journal of Microbiological Methods*, 139, 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.06.002>
- García-Solache, M., & Rice, L. B. (2019, April 1). The enterococcus: A model of adaptability to its environment. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>
- Giello, M., La Stora, A., Masucci, F., Di Francia, A., Ercolini, D., & Villani, F. (2017). Dynamics of bacterial communities during manufacture and ripening of traditional Caciocavallo of Castelfranco cheese in relation to cows' feeding. *Food Microbiology*, 63, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.016>
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 88, pp. 215–222). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00183-1)
- Gonç alves Martins Gonzalez, A., Peres Marques, arcia, da Silva Amorim Gomes, M., Campos do Couto BeltrãoBeltr, J., Gabriel Pinheiro, M., Maria Ramires Esper, L., ... Aguiar-Alves, abio. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in minas frescal cheese: evaluation of

- classic enterotoxin genes, antimicrobial resistance and clonal diversity. *Fnx232 FEMS Microbiology Letters*, 364(23). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx232>
- Gong, H. S., Meng, X. C., & Wang, H. (2010). Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China. *Food Control*, 21(1), 89–96.
- González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J. M., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, 18(6), 716–722. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.03.008>
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016, June 1). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Granados Rojas, L., Álvarez López, C. J., San José, E., & De, J. (2007). Estudio técnico de la denominación de origen del queso turrialba Para su inscripción en el Registro de la Propiedad Industrial costarricense. Retrieved from <http://www.fao.org/fileadmin/templates/olq/documents/costarica/ppp/Miercoles/documentacion/EstudioTecnico.pdf>
- Grande Burgos, M., Pulido, R., del Carmen López Aguayo, M., Gálvez, A., & Lucas, R. (2014). The cyclic antibacterial peptide enterocin as-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms151222706>
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., & Hammami, R. (2018, August 3). The genus Enterococcus: Between probiotic potential and safety concerns-an update. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791>
- Heng, N. C. K., Wescombe, P. a., Burton, J. P., Jack, R. W., & Tagg, J. R. (2007). The diversity of bacteriocins in gram-positive bacteria. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*, 45–92.
- Herrera, F. C., García-López, M. L., & Santos, J. A. (2016). Short communication: Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk fresh cheese in Colombia. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 7872–7876. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11322>
- ICONTEC. Instituto de Normas Técnicas de Colombia (2009). Norma Técnica Colombiana 4092. Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos., 76. Retrieved from <http://service.udes.edu.co/modulos/documentos/karenmartinez/50159704-NTC4092.pdf>
- INVIMA. Instituto de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos de Colombia. (1986). Resolución

- 02310 de 1986. Por la cual se reglamenta parcialmente el Título V de la Ley 09 de 1979, en lo referente a procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de los derivados lácteos. Retrieved July 14, 2020, from [https://www.invima.gov.co/documents/20143/441425/resolucion\\_02310\\_1986.pdf/64615e1e-8373-b43e-e595-037af034b802](https://www.invima.gov.co/documents/20143/441425/resolucion_02310_1986.pdf/64615e1e-8373-b43e-e595-037af034b802)
- ISO. International Organization for Standardization. (1999). ISO - ISO 6888-1:1999 - Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) — Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. Retrieved July 16, 2020, from <https://www.iso.org/standard/23036.html>
- ISO. International Organization for Standardization. (2017a). ISO 11290-1:2017(E). Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. Retrieved from [www.sis.se/buythentirestandardviahttps://www.sis.se/std-921869www.iso.orgThispreviewisdownloadedfromwww.sis.se.Buythentirestandardviahttps://www.sis.se/std-921869](https://www.sis.se/buythentirestandardviahttps://www.sis.se/std-921869www.iso.orgThispreviewisdownloadedfromwww.sis.se.Buythentirestandardviahttps://www.sis.se/std-921869)
- ISO. International Organization for Standardization. (2017b). ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* —. Retrieved from [www.sis.se/buythentirestandardviahttps://www.sis.se/std-921516www.iso.orgThispreviewisdownloadedfromwww.sis.se.Buythentirestandardviahttps://www.sis.se/std-921516](https://www.sis.se/buythentirestandardviahttps://www.sis.se/std-921516www.iso.orgThispreviewisdownloadedfromwww.sis.se.Buythentirestandardviahttps://www.sis.se/std-921516)
- Iwatani, S., Zendo, T., Yoneyama, F., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2007). Characterization and structure analysis of a novel bacteriocin, lacticin Z, produced by *Lactococcus lactis* QU 14. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(8), 1984–1992. <https://doi.org/10.1271/bbb.70169>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology Journals. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>
- Kable, M. E., Srisengfa, Y., Laird, M., Zaragoza, J., McLeod, J., Heidenreich, J., & Marco, M. L. (2016). The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. *MBio*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00836-16>
- Kaktcham, P. M., Tchamani Piame, L., Sandjong Sileu, G. M., Foko Kouam, E. M., Temgoua, J. B., Zambou Ngoufack, F., & de Lourdes Pérez-Chabela, M. (2019). Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3MT isolated from freshwater Nile Tilapia: isolation, safety traits, bacteriocin

- characterisation, and application for biopreservation in fish pâté. *Archives of Microbiology*, 201(9), 1249–1258. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01690-4>
- Kamimura, B. A., De Filippis, F., Sant’Ana, A. S., & Ercolini, D. (2019). Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. *Food Microbiology*, 80, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.014>
- Kanamori, H., Yano, H., Hirakata, Y., Endo, S., Arai, K., Ogawa, M., ... Kaku, M. (2013). High prevalence of extended-spectrum b-lactamases and qnr determinants in *Citrobacter* species from Japan: dissemination of CTX-M-2. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 2255–2262. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr283>
- Kaur, G., Singh, T. P., & Malik, R. K. (2013). Antibacterial efficacy of Nisin, Pediocin 34 and Enterocin FH99 against *Listeria monocytogenes* and cross resistance of its bacteriocin resistant variants to common food preservatives. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 63–71. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000025>
- Kavas, G., Kavas, N., & Saygili, D. (2015). the effects of thyme and clove essential oil fortified edible films on the physical, chemical and microbiological characteristics of kashar cheese. *Journal of Food Quality*, 38(6), 405–412. <https://doi.org/10.1111/jfq.12157>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Rg Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glö Ckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Kindstedt, P. (2012). *Cheese and culture a history of cheese and its place in western civilization*. Chelsea Green Publishing. Los Angeles. USA. 253p. DOI:10.5860/choice.50-0256.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., & Uchiyama, H. (2008). Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(4), 381–386. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.381>
- Kulwichit, W., Nilgate, S., Chatsuwat, T., Krajiw, S., Unhasuta, C., & Chongthaleong, A. (2007). Accuracies of *Leuconostoc* phenotypic identification: A comparison of API systems and conventional phenotypic assays. *BMC Infectious Diseases*, 7(1), 69. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-69>
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171–177. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2019.01.002>
- Kümmel, J., Stessl, B., Gonano, M., Walcher, G., Bereuter, O., Fricker, M., ... Ehling-Schulz, M. (2016). *Staphylococcus aureus* entrance into the dairy chain: tracking *S. aureus* from dairy cow

- to cheese. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01603>
- Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., ... Hattori, M. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsm018>
- Langa, S., Martín-Cabrejas, I., Montiel, R., Landete, J. M., Medina, M., & Arqués, J. L. (2014). Short communication: Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 6116–21. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8306>
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2013). Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *International Journal of Food Microbiology*, 161(2), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.028>
- Lee, H. J., Joo, Y. J., Park, C. S., Kim, S. H., Hwang, I. K., Ahn, J. S., & Mheen, T. I. (1999). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 isolated from kimchi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(2), 153–159. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80194-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80194-7)
- Lima, S. F., Bicalho, M. L. de S., & Bicalho, R. C. (2018). Evaluation of milk sample fractions for characterization of milk microbiota from healthy and clinical mastitis cows. *PLOS ONE*, 13(3), e0193671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193671>
- López de Heredia, U. (2016). Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Naturales*, 64. <https://doi.org/10.21630/mcn.2016.64.07>
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2010). Microbiología - Biología de los microorganismos (Brock) - madigan, martinko y parker - 10ed.pdf - Google Drive. (P. H. Pearson, Ed.) (10th ed.). Retrieved from <https://drive.google.com/file/d/0B3i4iMpIY5O1VXd4RnN1MUNick/view>
- Maldonado, N., Robledo, C., & Robledo, J. (2018). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*, 22(1), 35–45.
- Mantovani, H. C., & Russell, J. B. (2001). Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 808–813. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.808-813.2001>
- Martínez, B., García, P., & Rodríguez, A. (2019, April 1). Swapping the roles of bacteriocins and bacteriophages in food biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.007>
- Martínez Viedma, P., Abriouel, H., Sobrino López, A., Ben Omar, N., Lucas López, R., Valdivia, E., ... Gálvez, A. (2009). Effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against the spoilage bacterium *Lactobacillus diolivorans* in apple juice.

- Food Microbiology*, 26(5), 491–496.
- Masiello, S. N., Martin, N. H., Trmčić, A., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2016). Identification and characterization of psychrotolerant coliform bacteria isolated from pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 130–140. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9728>
- Melas, D. S., Papageorgiou, D. K., & Mantis, A. I. (1999). Enumeration and confirmation of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, and *Aeromonas sobria* isolated from raw milk and other milk products in northern Greece. *Journal of Food Protection*, 62(5), 463–466. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.5.463>
- Melo, J., Andrew, P. W., & Faleiro, M. L. (2015, January 1). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Research International*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.031>
- Merck. (2020a). Caldo LMX modificado según MANAFI y OSSMER | 110620. Retrieved July 22, 2020, from [https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/LMX-broth-modified-acc.-to-MANAFI-and-OSSMER,MDA\\_CHEM-110620#anchor\\_TI](https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/LMX-broth-modified-acc.-to-MANAFI-and-OSSMER,MDA_CHEM-110620#anchor_TI)
- Merck. (2020b). Singlepath® Salmonella | 104140. Retrieved July 15, 2020, from [https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Singlepath-Salmonella,MDA\\_CHEM-104140](https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Singlepath-Salmonella,MDA_CHEM-104140)
- Metzker, M. L. (2010, January 8). Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Mills, S., Griffin, C., O'Connor, P. M., Serrano, L. M., Meijer, W. C., Hill, C., & Ross, R. P. (2017). A multibacteriocin cheese starter system, comprising nisin and lacticin 3147 in *Lactococcus lactis*, in combination with plantaricin from *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(14), 799–816. <https://doi.org/10.1128/AEM.00799-17>
- Mirhosseini, M., & Afzali, M. (2016). Investigation into the antibacterial behavior of suspensions of magnesium oxide nanoparticles in combination with nisin and heat against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in milk. *Food Control*, 68, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.048>
- Miri, S. T., Dashti, A., Mostaan, S., Kazemi, F., & Bouzari, S. (2017). Identification of different *Escherichia coli* pathotypes in north and north-west provinces of Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 9(1), 33–37. Retrieved from <http://ijm.tums.ac.ir>
- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., ... Yadav, H. (2008). Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of Digestive Diseases*, 9(4), 190–198. <https://doi.org/10.1111/j.1751-2980.2008.00345.x>
- Montero, D., Boderó, M., Riveros, G., Lapierre, L., Gaggero, A., Vidal, R. M., & Vidal, M. (2015).

- Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), 384. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00384>
- Montiel, R., Martín-Cabrejas, I., & Medina, M. (2015). Reuterin, lactoperoxidase, lactoferrin and high hydrostatic pressure on the inactivation of food-borne pathogens in cooked ham. *Food Control*, 51, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.010>
- Morgan, S. M., O'Connor, P. M., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2005). Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic lacticin 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2606–2611. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2606-2611.2005>
- Muñoz, A. I., Vargas, M., Otero, L., Díaz, G., & Guzmán, V. (2011). Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. *Biomedica*, 31(3), 428–439. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i3.394>
- Muñoz, A., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., & Valdivia, E. (2004). Biocontrol of psychrotrophic enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a nonfat hard cheese by an enterococcal strain-producing enterocin AS-48. *Journal of Food Protection*, 67(7), 1517–1521. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.7.1517>
- Mutukumira, A. N., Ang, J., & Lee, S. J. (2015). *Beneficial Microorganisms in Food and Nutraceuticals* (Vol. 27). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23177-8>
- Ndoye, B., Rasolofo, E. A., LaPointe, G., & Roy, D. (2011). A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science and Technology*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0031-8>
- Neira Bermúdez, E., & de Silvestri Saade, J. A. (2006). Análisis del proceso de ordeño y de la calidad higiénica de la leche utilizada en la fabricación del queso Paipa en el municipio de Paipa (Boyacá), Colombia 1 Milking process and sanitary quality analysis of milk used in Paipa cheese production in Paipa. *Revista de Investigación Universidad de La Salle*, 6(2), 163–170. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/952/95260203.pdf>
- Nieto-Lozano, J. C., Reguera-Useros, J. I., Peláez-Martínez, M. del C., Sacristán-Pérez-Minayo, G., Gutiérrez-Fernández, Á. J., & la Torre, A. H. de. (2010). The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control*, 21(5), 679–685. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.007>
- O'Neill, J. (2014). *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*.

Retrieved July 17, 2020, from [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)

- O'sullivan, D. J., Cotter, P. D., O'sullivan, O., Giblin, L., Mcsweeney, P. L. H., & Sheehan, J. J. (2015). temporal and spatial differences in microbial composition during the manufacture of a continental-type cheese. <https://doi.org/10.1128/AEM.04054-14>
- O'Sullivan, D. J., Giblin, L., McSweeney, P. L. H., Sheehan, J. J., & Cotter, P. D. (2013). Nucleic acid-based approaches to investigate microbial-related cheese quality defects. *Frontiers in Microbiology*, 4 (art.1). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00001>
- Ocampo, I. D., González, C., Moreno, S. L., Calderón, C., Flórez Elvira, L. J., Olaya, M. B., ... Lesmes, M. C. (2019). Presence of *Listeria monocytogenes* in fresh artisanal cheese marketed in Cali-Colombia. *Acta Agronomica*, 68(2), 108–114. <https://doi.org/10.15446/acag.v68n2.77185>
- OIE. World Organisation for Animal Health (2020). Sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos. Retrieved July 17, 2020, from <https://www.oie.int/es/para-los-periodistas/amr-es/>
- Olvera-García, M., Eduardo, C., Maricarmen, S., Conjunto, E., Alimentos, D. De, Química, F. De, ... México, A. De. (2015). Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. *Biotecnología*, 19(1), 25–43.
- Ombarak, R. A., Hinenoya, A., Elbagory, A. R. M., & Yamasaki, S. (2018). Prevalence and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from raw milk and raw milk cheese in Egypt. *Journal of Food Protection*, 81(2), 226–232. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-277>
- Oscáriz, J. C., & Pisabarro, A. G. (2001). Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *International Microbiology*, 4(1), 13–19. <https://doi.org/10.1007/s101230100003>
- Oviespaña. (2019). España se encuentra en los últimos puestos europeos en el consumo de queso per cápita - Oviespaña. Retrieved July 14, 2020, from <https://www.oviespana.com/informacion-de-ovino/servicio-diario-de-noticias/noticias/espana-se-encuentra-en-los-ultimos-puestos-europeos-en-el-consumo-de-queso-per-capita>
- Pacheco Bautista, D., González Pérez, M., & Algreto Badillo, I. (2015). De la secuenciación a la aceleración hardware de los programas de alineación de ADN, una revisión integral. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, 36(3), 259–277. <https://doi.org/10.17488/RMIB.36.3.6>

- PAHO, Organización Panamericana de la Salud (2020). Diagnóstico e investigación epidemiológica de las ETAs. Retrieved July 20, 2020, from <https://www.paho.org/arg/publicaciones/publicacionesvirtuales/libroETAs/modulo2/modulo2n.html>
- Papathanasopoulos, M. A., Dykes, G. A., Revol-Junelles, A. M., Delfour, A., Von Holy, A., & Hastings, J. W. (1998). Sequence and structural relationships of leucocins A-, B- and C-TA33a from *Leuconostoc mesenteroides* TA33a. *Microbiology*, *144*(5), 1343–1348. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-5-1343>
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *50*(3), 512–542. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000300018>
- Parveen Rani, R., Anandharaj, M., Hema, S., Deepika, R., & David Ravindran, A. (2016). Purification of antilisterial peptide (Subtilisin A) from novel *Bacillus tequilensis* FR9 and demonstrate their pathogen invasion protection ability using human carcinoma cell line. *Frontiers in Microbiology*, *7*(DEC), 1910. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01910>
- Peng, S., Hoffmann, W., Bockelmann, W., Hummerjohann, J., Stephan, R., & Hammer, P. (2013). Fate of Shiga toxin-producing and generic *Escherichia coli* during production and ripening of semihard raw milk cheese. *Journal of Dairy Science*, *96*(2), 815–823. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5865>
- Pérez Pulido, R., Toledo, J., Grande, M. J., Gálvez, A., & Lucas, R. (2015). Analysis of the effect of high hydrostatic pressure treatment and enterocin AS-48 addition on the bacterial communities of cherimoya pulp. *International Journal of Food Microbiology*, *196*, 62–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.033>
- Peter, S., Wolz, C., Kaase, M., Marschal, M., Schulte, B., Vogel, W., ... Willmann, M. (2014). Emergence of *Citrobacter freundii* carrying IMP-8 metallo- $\beta$ -lactamase in Germany. *New Microbes and New Infections*, *2*(2), 42–45. <https://doi.org/10.1002/nmi.2.36>
- Pimentel-Filho, N. de J., Mantovani, H. C., de Carvalho, A. F., Dias, R. S., & Vanetti, M. C. D. (2014). Efficacy of bovicin HC5 and nisin combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh cheese. *International Journal of Food Science & Technology*, *49*(2), 416–422. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12316>
- Porcellato, D., & Skeie, S. B. (2016). Bacterial dynamics and functional analysis of microbial metagenomes during ripening of Dutch-type cheese. *International Dairy Journal*, *61*, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.05.005>
- Portafolio. (2019). Consumo de queso sigue creciendo en Colombia | Negocios | Portafolio. Retrieved

- July 14, 2020, from <https://www.portafolio.co/negocios/consumo-de-queso-sigue-creciendo-en-colombia-530645>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Quesos.es. (2020a). Francia Archives - Quesos.es, todo sobre quesos. Retrieved July 14, 2020, from <https://quesos.es/quesos-del-mundo/francia>
- Quesos.es. (2020b). Grecia Archives - Quesos.es, todo sobre quesos. Retrieved July 14, 2020, from <https://quesos.es/quesos-del-mundo/grecia>
- Quesos.es. (2020c). Variedades de Queso en Italia - Quesos.es, todo sobre quesos. Retrieved July 14, 2020, from <https://quesos.es/variedades-de-queso-en-italia/2421>
- Quigley, L., McCarthy, R., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., Cotter, P. D. (2013). The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 4928–4937. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6688>
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Paul Ross, R., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2012a). A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 113(1), 96–105.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2012b). High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5717–5723. <https://doi.org/10.1128/AEM.00918-12>
- RENAVE. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica de España (2018). Informe epidemiológico de listeriosis. Casos notificados a la RENAVE en los años 2015-2018. Retrieved July 21, 2020, from [https://www.mschs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/Informe\\_listeriosis-RENAVE\\_2808209.pdf](https://www.mschs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/Informe_listeriosis-RENAVE_2808209.pdf)
- Ribeiro, S. C., O'Connor, P. M., Ross, R. P., Stanton, C., & Silva, C. C. G. (2016). An anti-listerial *Lactococcus lactis* strain isolated from Azorean Pico cheese produces lacticin 481. *International Dairy Journal*, 63, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.07.017>
- Riquelme, C., Câmara, S., Enes Dapkevicius, M. de L. N., Vinuesa, P., da Silva, C. C. G., Malcata, F. X., & Rego, O. A. (2015). Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). *International Journal of Food Microbiology*, 192, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.031>
- Robayo, A. M., & Pachón, F. A. (2013). Caracterización de la cadena de los quesos paipa y campesino

- en el marco del programa mercados campesinos: dos estudios de caso, *60*(3), 196–212.
- Rodríguez, E., Arques, J. L., Nuñez, M., Gaya, P., Medina, M., & Nun, M. (2005). Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in raw-milk cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(7), 3399–3404. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3399>
- Rodríguez Villanueva, G. L. (2007). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso Paipa elaborado en los municipios de pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá). Universidad de la Salle. Retrieved from <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/6749/13992026.pdf?sequence=1>
- Romero, J. L., Grande Burgos, M. J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., & Lucas, R. (2017). Resistance to antibiotics, biocides, preservatives and metals in bacteria isolated from seafoods: co-selection of strains resistant or tolerant to different classes of compounds. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1650. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01650>
- Rose, N. L., Sporns, P., & McMullen, L. M. (1999). Detection of bacteriocins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(5), 2238–2242. <https://doi.org/10.1128/aem.65.5.2238-2242.1999>
- Rossi, L., Watson, D., Escandarani, S., Miranda, A., & Troncoso, A. (2009). La radiación a la mesa. *Infectología Del Día*, *24*(4), 318–330.
- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Gómez, A. M., Perdomo, S., & García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica*, *61*(2). <https://doi.org/10.11144/javeriana.umed61-2.sngs>
- Rudolf, M., & Scherer, S. (2001). High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *63*(1–2), 91–98. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00413-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00413-X)
- Sánchez-Hidalgo, M., Montalbán-López, M., Cebrián, R., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., & Maqueda, M. (2011). AS-48 bacteriocin: Close to perfection. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0724-4>
- Santos, J. A., López-Díaz, T. M., García-Fernández, M. C., García-López, M. L., & Otero, A. (1996). Villalón, a fresh ewe's milk Spanish cheese, as a source of potentially pathogenic *Aeromonas* strains. *Journal of Food Protection*, *59*(12), 1288–1291. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.12.1288>
- Schirru, S., Todorov, S. D., Favaro, L., Mangia, N. P., Basaglia, M., Casella, S., ... Deiana, P. (2012). Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. *Food Control*, *25*(1), 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.060>

- Schmieder, R., Edwards, R., & Bateman, A. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics Applications Note*, 27(6), 863–864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>
- Schuetz, A. N. (2019). Emerging agents of gastroenteritis: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and the diarrheagenic pathotypes of *Escherichia coli*. *Seminars in Diagnostic Pathology*. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2019.04.012>
- Seifu, E., Buys, E. M., & Donkin, E. F. (2005). Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: A review. *Trends in Food Science and Technology*.
- Shahin, K., Bouzari, M., Wang, R., & Yazdi, M. (2019). Prevalence and molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* species of food origins and their inactivation by specific lytic bacteriophages. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108252. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108252>
- Shin, S.-Y., & Han, N. S. (2015). *Leuconostoc* spp. as Starters and Their Beneficial Roles in Fermented Foods (pp. 111–132). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-23177-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23177-8_5)
- SIC-Colombia. Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia (2011). Por la cual se decide una solicitud de denominación de origen del queso Paipa. Retrieved July 14, 2020, from [https://www.sic.gov.co/sites/default/files/files/Denominacion de Origen/Agro - Alimenticios/Queso Paipa/queso\\_paipa.pdf](https://www.sic.gov.co/sites/default/files/files/Denominacion%20de%20Origen/Agro%20Alimenticios/Queso%20Paipa/queso_paipa.pdf)
- Silva, F. V. M., & Gibbs, P. A. (2012). Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods. *Food Research International*, 45(2), 695–699. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.018>
- Silvetti, T., Capra, E., Morandi, S., Cremonesi, P., Decimo, M., Gavazzi, F., ... Brasca, M. (2017). Microbial population profile during ripening of Protected Designation of Origin (PDO) Silter cheese, produced with and without autochthonous starter culture. *LWT*, 84, 821–831. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.022>
- SOLiD (ThermoFisher) - AllSeq. (n.d.). Retrieved July 14, 2020, from <https://allseq.com/knowledgebank/ngs-necropolis/solid/>
- Soto-Varela, Z. E., Gutiérrez, C. G., de Moya, Y., Mattos, R., Bolívar-Anillo, H. J., & Villarreal, J. L. (2018). Molecular detection of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Brucella* spp. in fresh artisanal cheese marketed in the city of Barranquilla: A pilot study. *Biomedica*, 38, 30–36. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.V38I3.3677>
- Srivastava, N., Gupta, B., Gupta, S., Danquah, M. K., & Sarethy, I. P. (2019). Analyzing functional microbial diversity. In *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 79–102). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814849-5.00006-x>

- Stellato, G., De Filippis, F., La Stora, A., & Ercolini, D. (2015). Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(22), 7893–7904. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-15>
- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Virginia Villegas, M. (2008). Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Asociación Colombiana de Infectología*, *12*(3), 223–233.
- Tekiner, İ. H., & Özpınar, H. (2016). Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing enterobacteriaceae from foods of animal origin. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*(2), 444–451. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.034>
- Téllez-Luis, S. J.; Ramírez, J. A.; Pérez-Lamela, C.; Vázquez, M.; Simal-Gándara, J. (2015). Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, *3*(2), 66–80. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/11358120109487649>
- Tot Formatge. (2020). El queso: clasificaciones. Retrieved July 14, 2020, from <http://totformatge.com/es/formatgepedia/el-queso-clasificaciones/#lightbox/1/>
- Trujillo, C., Gallego, A., Ramírez, N., & Palacio, L. (2010). Prevalence of mastitis in dairy herds in Eastern Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *24*, 11–18. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/2950/295022380003.pdf>
- Uraz, G., Coskun, S., & Ozer, B. (2008). Microflora and pathogen bacteria (*Salmonella*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) in Urfa cheese (a traditional white-brined Turkish cheese). *Pakistan Journal of Nutrition*, *7*(5), 630–635. <https://doi.org/10.3923/pjn.2008.630.635>
- Van Tongeren, S. P., Degener, J. E., & Harmsen, H. J. M. (2011). Comparison of three rapid and easy bacterial DNA extraction methods for use with quantitative real-time PCR. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *30*(9), 1053–1061. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1191-4>
- Vandera, E., Kakouri, A., Koukkou, A. I., & Samelis, J. (2019). Major ecological shifts within the dominant nonstarter lactic acid bacteria in mature Greek Graviera cheese as affected by the starter culture type. *International Journal of Food Microbiology*, *290*, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.014>
- Vartoukian, S. R., Palmer, R. M., & Wade, W. G. (2010). Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, *309*(1), no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x>
- Vijayakumar, R., Sandle, T., Al-Aboody, M. S., AlFonaisan, M. K., Alturaiki, W., Mickymaray, S., ... Alsagaby, S. A. (2018). Distribution of biocide resistant genes and biocides susceptibility in

- multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* — A first report from the Kingdom of Saudi Arabia. *Journal of Infection and Public Health*, 11(6), 812–816. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.05.011>
- Wesgate, R., Grasha, P., & Maillard, J. Y. (2016). Use of a predictive protocol to measure the antimicrobial resistance risks associated with biocidal product usage. *American Journal of Infection Control*, 44(4), 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.11.009>
- WHO. World Health Organization (2018a). *E. coli*. Retrieved July 22, 2020, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- WHO. World Health Organization (2018b). Listeriosis. Retrieved July 17, 2020, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
- WHO. World Health Organization (2018c). High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows. Retrieved July 17, 2020, from <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/>
- WHO. World Health Organization (2019). OMS | Listeriosis - España. Retrieved July 17, 2020, from <https://www.who.int/csr/don/16-september-2019-listeriosis-spain/es/>
- WHO. World Health Organization (2020). Inocuidad de los alimentos. Retrieved July 17, 2020, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Winkelströter, L. K., Tulini, F. L., & De Martinis, E. C. P. (2015). Identification of the bacteriocin produced by cheese isolate *Lactobacillus paraplantarum* FT259 and its potential influence on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.014>
- Wirawan, R. E., Klesse, N. A., Jack, R. W., & Tagg, J. R. (2006). Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1148–1156.
- Wold, B., & Myers, R. M. (2008, January 19). Sequence census methods for functional genomics. *Nature Methods*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmeth1157>
- Xtrem-Biotech. (2018). Xtrem Biotech – Agricultural Probiotics. Retrieved July 16, 2020, from <http://www.xtrembiotech.com/en/>
- Xue, J., Yang, Y., Wang, Z., Guo, Y., & Shao, Y. (2018). Bacterial diversity in chinese rushan cheese from different geographical origins. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1920. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01920>
- Yao, Y., Imirzalioglu, C., Hain, T., Kaase, M., Gatermann, S., Exner, M., ... Chakraborty, T. (2014). Complete nucleotide sequence of a *Citrobacter freundii* plasmid carrying KPC-2 in a unique genetic environment. *Genome Announcements*, 2(6). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01157->

- Yeluri Jonnala, B. R., McSweeney, P. L. H., Sheehan, J. J., & Cotter, P. D. (2018). Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>
- Wang, Z., Russon, L., Li, L., Roser, D.C., & Long, S.R. (1998). Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 12(8). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19980430\)12:8<456:AID-RCM177>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19980430)12:8<456:AID-RCM177>3.0.CO;2-U)
- Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia*, 2, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>
- Zhu, Q., Gooneratne, R., & Hussain, M. (2017). *Listeria monocytogenes* in fresh produce: outbreaks, prevalence and contamination levels. *Foods*, 6(3), 21. <https://doi.org/10.3390/foods6030021>
- Zhu, X., Zhao, Y., Sun, Y., & Gu, Q. (2014). Purification and characterisation of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008. *Food Chemistry*, 165, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.034>
- Zou, J., Jiang, H., Cheng, H., Fang, J., & Huang, G. (2018). Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.233>

## **X.- ANEXOS**

## MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS

### **PDA SUPLEMENTADO CON CLORANFENICOL (g/L) (Oxoid CM0139)**

**Composición:** peptona de patata 4 g, glucosa 20 g, agar agar 15 g.

**Preparación:** disolver 39 g del polvo y 30 mg de cloranfenicol en 1 L de agua destilada y agitar hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. No sobrecalentar. Servir en cajas de Petri estériles.

### **AGAR NUTRITIVO (g/L) (Oxoid CM-033B)**

**Composición:** peptona 5 g, extracto de carne 3 g, cloruro de sodio 5 g, agar agar 15 g.

**Preparación:** disolver 28 g del polvo en 1 L de agua destilada y agitar hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Servir en cajas de Petri estériles.

### **AGAR STANDART PLATE COUNT (SPC) (g/L) (Oxoid CM0463)**

**Composición:** peptona de caseína 5 g, extracto de levadura 2,5 g, glucosa 1g, agar agar 15g

**Preparación:** disolver 23,5 g del polvo en 1 L de agua destilada y agitar hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Servir en cajas de Petri estériles.

### **AGAR SALADO MANITOL (g/L) (Sharlau 01-116)**

**Composición:** extracto de carne 1, peptona de caseína 5, peptona de carne 5, manitol 10, cloruro sódico 75, rojo fenol 0,025, agar 15.

**Preparación:** disolver 111 g del polvo en 1 L de agua destilada y agitar hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Servir en cajas de Petri estériles.

#### **AGAR DE MAN, ROGOSA Y SHARPE (MRS) (g/L) (Sharlau 01-135)**

**Composición:** peptona proteosa 10, extracto de carne 8, extracto de levadura 4, glucosa 20, acetato de sodio 5, citrato de triamonio 2.0, fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ) 2, sulfato de magnesio 0,2, sulfato de manganeso 0.05, Polisorbato (Tween 80) 1, agar 14 (pH  $6,5 \pm 0,2$ ).

**Preparación:** disolver 66 g del polvo en 1 L de agua destilada y agitar hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a  $121^\circ C$  durante 15 minutos. No sobrecalentar. Servir en cajas de Petri estériles.

#### **AGAR CEREBRO CORAZÓN TAMPONADO ESTÉRIL (BHAT) (g/L)**

**Composición:** fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ) 9, dihidrogenofosfato de potasio ( $KH_2PO_4$ ) 4,085, caldo cerebro corazón (BHI) 35,15, agar 16,15.

**Preparación:** disolver los siguientes componentes (g/L):  $K_2HPO_4$  9,  $KH_2PO_4$  4,085, agar-agar 16,15, caldo cerebro corazón 35,15 y 950 mL de agua destilada.

#### **AGAR EOSINA AZUL DE METILENO (EMB) (g/L) (Sharlau 01-068)**

**Composición:** peptona 10, lactosa 10,  $K_2HPO_4$  2, eosina Y 0,4, azul de metileno 0,065, agar 15.

**Preparación:** agregar 37,5 g a un 1 L de agua destilada. Agitar hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a  $121^\circ C$  por 15 minutos. Servir en cajas de Petri estériles.

#### **AGAR CHROMOCULT COLIFORMES (g/L) (Merck 110426)**

**Composición:** peptona 3, NaCl 5g,  $KH_2PO_4$  1,7,  $K_2HPO_4$  3, piruvato de sodio 1, triptófano 1 0,065, mezcla de cromogénos (sustrato Salmon-GAL y X-glucurónido 0,2, agar 12.

**Preparación:** agregar 37,5 g a un 1 L de agua destilada. Agitar hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a  $121^\circ C$  por 15 minutos. Servir en cajas de Petri estériles.

### **AGAR PALCAM (g/L) (Sharlau 01-470)**

**Composición:** triptona 23, cloruro de litio 15, manitol 10, cloruro de sodio 5, extracto de levadura 3, almidón 1, esculina 0,8, citrato de amonio férrico 0,5, dextrosa 0,5, rojo de fenol 0,08, agar 13. (pH  $7,2 \pm 0,2$ ).

**Preparación:** agregar 72 g a un 1 L de agua destilada. Agitar hasta ebullición Distribuir en botellas de 500 mL. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 50°C y asépticamente agregar a cada botella un vial de suplemento selectivo para agar Palcam 06-110-LYO). Mezclar bien y distribuir en cajas de Petri estériles.

### **AGAR Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) (g/L) (Sharlau 01-211)**

**Composición:** xilosa 3,5, L-lisina 5, lactosa 7,5, sacarosa 7,5, cloruro de sodio 5, extracto de levadura 3, rojo de fenol 3, desoxicolato de sodio 2,5, tiosulfato de sodio 6,8, citrato de amonio férrico 0,8, agar 15.

**Preparación:** disolver 56,58 g en 1L de agua destilada constantemente hasta ebullición. Distribuir en cajas de Petri estériles No autoclavar.

### **AGAR Kanamicina, Esculina, Azida (KKA) (g/L) (Sharlau 01-263)**

**Composición:** triptona 20, extracto de levadura, 5, cloruro de sodio 5, citrato disódico 1, esculina 1, citrato de amonio férrico 0,5, azida de sodio 0,15, sulfato de kanamicina 0,02, agar 15.

**Preparación:** agregar 48 g a un 1 L de agua destilada. Agitar hasta ebullición Distribuir en cajas de Petri estériles. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

### **AGAR BASE SANGRE (g/L) (Sharlau 01-352)**

**Composición:** extracto de carne 10, triptona 10, cloruro de sodio 5, agar 15.

**Preparación:** suspender 40 g en 950 mL de agua destilada. Calentar hasta punto de ebullición. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 50°C y asépticamente agregar 50 mL de sangre desfibrinada.

**AGAR BAIRD PARKER (g/L) (Sharlau 01-030)**

**Composición:** triptona 10, piruvato de sodio 10, glicina 12, extracto de carne 5, cloruro de litio 5, extracto de levadura 1, agar 17.

**Preparación:** suspender 60 g en 950 mL de agua destilada. Agitar constantemente hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 50°C y asépticamente agregar 50 mL del suplemento yema de huevo más telurito (06-026). Homogenizar y distribuir en cajas de Petri estériles.

**AGAR CHINA BLUE (g/L) (Oxoid CM0209)**

**Composición:** peptone 5, 'Lab-Lemco' powder 3, lactose 10, cloruro de sodio 5, china blue 0,375, agar-agar 12,0. (pH 7,2 ± 0,2).

**Preparación:** suspender 35 g en 1 L de agua destilada. Hervir para disolver completamente. Esterilizar mediante autoclavación a 121°C durante 15 minutos.

**AGAR MOSSEL (g/L) (Merck 1.05267.0500)**

**Composición:** peptona de caseína 10, extracto de carne 1, D-manitol 10, Cloruro de sodio 10, rojo de fenol 0,025, agar 12.

**Preparación:** Disolver 43 g del polvo en 900 mL de agua destilada y agitar hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 50°C y asépticamente agregar 100 mL del suplemento yema de huevo y 0,1 g/L desulfato de polimixina B. Homogenizar y distribuir en cajas de Petri estériles.

**CALDO NUTRITIVO (g/L) (Oxoid CM-003)**

**Composición:** peptona 5, extracto de carne 3, cloruro de sodio 5

**Preparación:** disolver 13 del polvo en 1 L de agua destilada y agitar hasta ebullición, dispensar en tubos. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Servir en cajas de Petri.

### **CALDO LMX FLUOROCULT (g/L) (Merck 110620)**

**Composición:** triptosa 5, cloruro de sodio 5, sorbitol 1, triptófano 1, hidrógeno fosfato dipotásico 2,7, dihidrógeno fosfato de potasio 2, lauril sulfato de sodio 0,1, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-GAL) 0,08, 4-metilumberiferil  $\beta$ -D glucorónido (MUG) 0,05, 1-isopropil  $\beta$ -D-1-tio-galactopiranosido (IPTG) 0,01.

**Preparación:** Disolver 17 g del polvo en 1 L de agua destilada y agitar hasta ebullición. Dispensar en tubos tapa rosca de 15x150 mm. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

### **CALDO BHI (g/L) (Oxoid CM1135B)**

**Composición:** extracto de cerebro 12,5, extracto de corazón 5, peptona proteasa 10, cloruro de sodio 5, fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 2,5, glucosa 2, agar agar 15.

**Preparación:** Disolver 52 g del polvo en 1 L de agua destilada y agitar hasta ebullición, dispensar en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Para preparar el caldo BHI suplementado con glicerol al 40% agregue 40 mL de glicerol y 60 mL del caldo.

### **CALDO FRASER (g/L) (Sharlau 02-472)**

**Composición:** proteasa peptona 5, triptona 23, extracto de carne 5, extracto de levadura 5, cloruro de sodio 20, esculina 1, hidrógeno fosfato dipotásico 1,35 g, dihidrógeno fosfato de potasio 12 g (pH 7,2  $\pm$  0,2).

**Preparación:** adicionar 53,35 g a un 1 L de agua destilada. Agitar hasta ebullición. Distribuir en botellas de 500 mL. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y asépticamente agregar a cada botella un vial de suplemento UVM I para enriquecimiento primario (06-110-LYO) y el suplemento UVM II para enriquecimiento secundario (06-111-LYO).

### **CALDO RAPPAPORT VASSILIADIS (g/L) (Sharlau 02-379)**

**Composición:** peptona de soja 4,5, cloruro de sodio 7,2, monofosfato de potasio 1,26, fosfato dipotásico 0,18, cloruro de magnesio 13,580, verde de malaquita 0,036. (pH 7,2  $\pm$  0,2).

**Preparación:** Disolver 26,8 g del polvo en 1 L de agua destilada y agitar hasta ebullición, dispensar en tubos y esterilizar en autoclave a 115°C durante 15 minutos.

**CALDO MRS (g/L) (Sharlau 02-135)**

**Composición:** peptona proteosa 10, extracto de carne 8, extracto de levadura 4, glucosa 20, acetato de sodio 5, citrato de triamonio 2, fosfato dipotasico 2, sulfato de magnesio 0,2, sulfato de manganeso 0,05, Polisorbato (Tween 80) 1. (pH 6,2 ± 0,2).

**Preparación:** disolver 52 g del polvo en 1 L de agua destilada y agitar hasta ebullición. Dispensar en tubos o en frascos. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. No sobre calentar.

## COLORANTES

### CRISTAL VIOLETA

**Composición:** **solución A:** cristal violeta 2 g, alcohol etílico 95% 20 mL. **Solución B:** oxalato de amonio 0,8 g y agua destilada 80 mL.

**Preparación:** disolver el cristal violeta en el alcohol y el oxalato de amonio en agua destilada. Mezclar las dos soluciones. Dejar reposar 24 h y filtrar antes de usar. Envasar en frasco oscuro.

### LUGOL

**Composición:** Cristales de yodo 1 g, yoduro de potasio 2 g, agua destilada 300 mL.

**Preparación:** pulverice en un mortero el yodo y yoduro de potasio secos. Agregar agua poco a poco y agite lentamente hasta que se hayan disueltos completamente los reactivos. Mezclar esta solución en un frasco de vidrio oscuro y completar el volumen de agua destilada.

### ALCOHOL ACETONA

**Composición:** Alcohol etílico 95% 50 mL, acetona 50 mL.

**Preparación:** mezclar las dos soluciones y envasar en un frasco oscuro.

### FUSCINA BÁSICA

**Composición:** Fuscina básica 1 g, alcohol absoluto 10 mL.

**Preparación:** Disolver la Fuscina básica en alcohol absoluto y envasar en un frasco oscuro.

### AZUL DE LACTOFENOL

**Composición:** Cristales de fenol 20 g, ácido láctico 20 mL, glicerol 40 mL, agua destilada 20 mL, azul de algodón 0,05.

**Preparación:** Disolver en agua los cristales de fenol, el ácido láctico y el glicerol calentando lentamente. Luego agregue los gramos de azul de algodón, mezcle y envase en un frasco oscuro.

Nota tener cuidado con el fenol es tóxico y corrosivo.

## SOLUCIONES

### **HIPOCLORITO DE SODIO AL 1% (Clorox, USA)**

**Preparación:** Mezclar 19 mL de hipoclorito sodio al 5,25% con 100 mL de agua destilada.

### **ETANOL AL 95% (Merck 107017)**

**Preparación:** Mezclar 95 mL de etanol absoluto con 5 mL de agua destilada.

### **ETANOL AL 70% (Merck 107017)**

**Preparación:** Mezclar 70 mL de etanol absoluto con 30 mL de agua destilada

### **CLORURO DE SODIO AL 0,85% (Merck 106404)**

**Preparación:** disolver 8,5 g de cloruro de sodio en 1000 mL de agua destilada.

### **CLORURO DE SODIO AL 1,5 M (Merck 106404)**

**Preparación:** disolver 43,83 g en 500 mL.

### **CLORURO DE SODIO AL 0,5 N (Merck 106404)**

**Preparación:** disolver 2,922 g en 100 mL.

### **HIDRÓXIDO DE SODIO AL 0,5 N (Merck 106482)**

**Preparación:** disolver 1,4 g de hidróxido de sodio en 50 mL de agua destilada. Luego, enrasar a 100 mL con agua destilada.

### **HIDRÓXIDO DE SODIO AL 10 (Merck 106482)**

**Preparación:** disolver 28 g de hidróxido de sodio en un balón aforado con 80 mL de agua destilada. Luego aforar a 100 mL con agua destilada.

### **EDTA AL 1 % (Sigma-Aldrich 03695)**

**Preparación:** disolver 0,1g de EDTA 10 mL destilada estéril.

**TWEEN 20 AL 1% (Sigma-Aldrich 822184)**

**Preparación:** disolver 0,1mL de Tween 20 en 10 mL destilada estéril.

**TWEEN 80 AL 1 % (Sigma-Aldrich P1754)**

**Preparación:** disolver 0,1mL de Tween 80 en 10 mL destilada estéril.

**DOCECIL SULFATO DE SODIO AL 1 % (Sigma 436143)**

**Preparación:** disolver 0,1mL de SDS en 10 mL destilada estéril.

**UREA AL 1M (Sigma-Aldrich U5378)**

**Preparación:** disolver 60,06 g en 1L de agua destilada.

**HCl AL 1 N (Merck 100317)**

**Preparación:** disolver 8,2 mL de ácido clorhídrico al 37% en 1L de agua destilada.

**HCl AL 0,02N (Merck 100317)**

**Preparación:** disolver 20 mL de una solución de ácido clorhídrico al 1 N en 1L de agua destilada.

**PEPSINA DE ESTOMAGO DE PORCINO (10 mg/mL) (FLUKA 77151)**

**Preparación:** disolver 10 mg en 1 mL de agua destilada estéril.

**TRIPSINA DE PÁNCREAS PORCINO 1:250 (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich 85450C)**

**Preparación:** disolver 10 mg en 1 mL de agua destilada estéril.

**PROTEINASA K (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich 1.24568)**

**Preparación:** disolver 10 mg en 1 mL de agua destilada estéril.

**NISINA (6 mg/mL) (Sigma-Aldrich N5764)**

**Preparación:** disolver 6 mg en 1L ácido clorhídrico 0,02 N.

**NISINA (12 mg/mL) (Sigma-Aldrich N5764)**

**Preparación:** disolver 6 mg en 1L ácido clorhídrico 0,02 N.

**NISINA AL 1% (Sigma-Aldrich N5764)**

**Preparación:** disolver 0,1 g 1% en 10 mL de agua destilada o NaCl al 0,85%.