



Universidad de Carabobo  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional  
Escuela de Bioanálisis  
Trabajo de Investigación



**Calidad Bacteriológica e Identificación de Bacterias Ácido Lácticas en Queso  
Arepero de Valle de La Pascua, Estado Guárico 2015-2016**

**Autoras:**

Aguilar, Paola  
Saavedra, Marielena  
Salaverria, Bárbara

**Tutor:**

Dra. Estalina Báez Ramirez

**Cotutor:**

Prof. Tomas Rojas

**Asesor metodológico:**

Prof. Emilia Barrios

Naguanagua, Noviembre 2017



Universidad de Carabobo  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional  
Escuela de Bioanálisis  
Trabajo de Investigación



### CONSTANCIA DE ACEPTACIÓN DEL TUTOR

Yo, Dra. Estalina Báez Ramírez. CI. V-11.688.736, por medio de la presente hago constar que he aceptado la tutoría del proyecto de investigación que lleva por título: **“Calidad Bacteriológica e Identificación de Bacterias Ácido Lácticas en Queso Arepero de Valle de La Pascua, Estado Guárico 2015-2016”**, el cual fue desarrollado en el quinto año de la carrera de Bioanálisis como Trabajo Especial de Grado por las Bachilleres: Saavedra, Marielena C.I. V-24.495.992 y Salaverria, Bárbara C.I: V-25.617.247, y la TSU. Aguilar, Paola C.I: V-19.468.217. Así mismo, certifico que he tenido conocimiento de esta investigación desde su inicio hasta su culminación y considero que reúne los requisitos suficientes para ser sometido a evaluación.

Fecha: 06 de Noviembre de 2017

Firma del Tutor



Universidad de Carabobo  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional  
Escuela de Bioanálisis  
Trabajo de Investigación



### CONSTANCIA DE ACEPTACIÓN DEL COTUTOR

Yo, Prof. Tomas Rojas. CI. V-7.014.751, por medio de la presente hago constar que he aceptado la cotutoría del proyecto de investigación que lleva por título: **“Calidad Bacteriológica e Identificación de Bacterias Ácido Lácticas en Queso Arepero de Valle de La Pascua, Estado Guárico 2015-2016”**, el cual fue desarrollado en el quinto año de la carrera de Bioanálisis como Trabajo Especial de Grado por las Bachilleres: Saavedra, Marielena C.I. V-24.495.992 y Salaverria, Bárbara C.I: V-25.617.247, y la TSU. Aguilar, Paola C.I: V-19.468.217. Así mismo, certifico que he tenido conocimiento de esta investigación desde su inicio hasta su culminación y considero que reúne los requisitos suficientes para ser sometido a evaluación.

Fecha: 06 de Noviembre de 2017

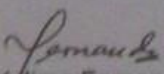
Firma del Cotutor




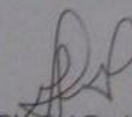
### ACTA DE EVALUACIÓN

Quienes suscriben, miembros del Jurado designado por la Coordinación de la Asignatura Trabajo de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud – Sede Carabobo, para evaluar el trabajo titulado: **"EVALUACIÓN DE LA CALIDAD BACTERIOLÓGICA E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN QUESO AREPERO DE VALLE DE LA PASCUA, ESTADO GUÁRICO 2015-2016"** presentado por las estudiantes: **Agullar Paola, Saavedra Marielena y Salaverria Barbara**, titulares de las cédulas de Identidad, **V-19.468.217, V-24.495.992 y V-25.617.247**, respectivamente; tutorado por la Dra. Estalina Bàez Ramírez, titular de la Cédula de Identidad No. **V-11.688.736**, y cotutoría con el Prof. **Tomas Rojas**, titular de la Cédula de Identidad No. **V-7.014.751**. Hacemos de su conocimiento que hemos actuado como jurado evaluador del informe escrito, presentación y defensa del citado trabajo. Consideramos que reúne los requisitos de mérito para su APROBACIÓN.

En fe de lo cual se levanta esta acta en Valencia al 06 del mes de noviembre del año 2017

  
Prof. Yolima Fernandez  
C.I: 13382234  
Jurado Principal

  
Prof. Mónica Sequera  
C.I: 11753718  
Jurado Principal

  
Prof. Gladel Padrón  
C.I: 12368844  
Jurado Principal



## ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria.....	vi
Agradecimiento.....	vii
Índice de Tablas.....	viii
Índice de Graficas.....	ix
Índice de imágenes.....	x
Resumen.....	xi
Introducción.....	1
Objetivos de la Investigación.....	10
Materiales y Métodos.....	11
Resultados.....	18
Discusión.....	25
Conclusión.....	28
Referencias Bibliográficas.....	29

## **DEDICATORIA**

En primer lugar a Nuestro **Dios** todo poderoso por su infinito amor y bondad, por guiarnos en todo momento y nunca abandonarnos.

A Nuestros amados **Padres**, por su amor, y apoyo incondicional, por darnos la fuerza necesaria para nunca decaer y cumplir así nuestros ideales.

A Nuestros queridos **Hermanos**, por motivarnos a cumplir tan anhelada meta.

A Nuestros tutores y asesora sin ellos no sería posible esta investigación.

A Nuestros familiares, amigos y compañeros que de una u otra manera contribuyeron en el logro de este objetivo.

*Aguilar Paola*  
*Saavedra Marielena*  
*Salaverria Bárbara*

## **AGRADECIMIENTO**

Le agradecemos a Dios primeramente por habernos acompañado a lo largo de este camino, por ser nuestra fortaleza en los momentos de debilidad y brindarnos una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad

Le damos las gracias a nuestros padres, por apoyarnos en todo momento, por los valores que nos han inculcado, y por habernos dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de la vida.

A nuestros hermanos por ser parte importante de nuestras vidas y representar la unidad familiar. Así como a nuestros compañeros sentimentales por el apoyo incondicional.

A la Universidad de Carabobo, por brindarnos sus espacios y convertirse en nuestros 2<sup>do</sup> hogar por un largo tiempo. Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, por darnos la oportunidad de realizar esta investigación, creciendo profesionalmente.

A la Dra. Estalina Báez Ramírez, por acompañarnos en este camino, sus conocimientos brindados, dedicación, sacrificios y paciencia con nosotras.

Al Prof. Rojas Tomas, por ser nuestro tutor, orientarnos en momentos difíciles y dedicarnos el tiempo necesario.

A Manuel Ruenes y Andrea Olivares, por su colaboración.

*Aguilar Paola*

*Saavedra Marielena*

*Salaverria Bárbara*

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>N°</b>	<b>Título</b>	<b>Pag.</b>
<b>1</b>	Oligonucleótidos utilizados en este estudio	<b>15</b>
<b>2</b>	Indicadores de calidad bacteriológica en muestras de queso arepero de Valle de la Pascua, Edo. Guárico	<b>18</b>
<b>3</b>	Capacidad de adhesión a la línea celular intestinal HT29 a través de las UFC en las diluciones de $10^{-3}$ y $10^{-4}$ .	<b>23</b>



## ÍNDICE DE GRAFÍCAS

Nº	Título	Pag.
1	Ensayo de resistencia a pH ácido de <i>Lactobacillus fermentum</i> . PBM04	20
2	Ensayo de resistencia a pH ácido de <i>L. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> PBM03	21
3	Ensayo de resistencia a pH ácido de <i>Weissella paramesenteroides</i> .PBM02	21
4	Ensayo de resistencia a pH ácido de <i>Pediococcus acidilactici</i> . PBM08	22
5	Resistencia a sales biliares de <i>L. fermentum</i> PBM04 y <i>L. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> PBM03	22
6	Resistencia a sales biliares de <i>W. paramesenteroides</i> PBM02 y <i>P. acidilactici</i> PBM08	23
7	Resultados de susceptibilidad a antibióticos en base a un halo de inhibición $\geq 5$ mm.	24
8	Actividad bactericida de cada aislado sobre <i>E. coli</i> 0157:H7 y <i>S. entérica</i>	25

## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>Nº</b>	<b>Título</b>	<b>Pag.</b>
<b>1</b>	Corrida electroforética de la amplificación del gen <i>rrs</i> del ARNr 16S	<b>19</b>
<b>2</b>	Alineación de la secuenciación de bases nucleotídicas para la identificación de la especie de las cepas en estudio	<b>20</b>



Universidad de Carabobo  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional  
Escuela de Bioanálisis  
Trabajo de Investigación



## Calidad Bacteriológica e Identificación de Bacterias Ácido Lácticas en Queso Arepero de Valle de La Pascua, Estado Guárico 2015-2016

**Autoras:** Aguilar Paola, Saavedra Marielena y Salaverria Bárbara

**Tutor:** Dra. Estalina Báez Ramírez

**Cotutora:** Prof. Tomas Rojas

**Asesor Metodológico:** Emilia Barrios

**Línea de Investigación:** Microbiología de alimentos

**Realizado en:** Departamento de Microbiología de la Universidad de Carabobo y Centro de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

### RESUMEN

El queso arepero es elaborado artesanalmente, consumido ampliamente en el país. Éstos son producidos con leche cruda, no pasteurizada, siendo un riesgo potencial para la salud. Posee un excelente sabor, determinado principalmente entre otros factores por sus componentes bacterianos, especialmente bacterias ácido lácticas (BAL). Las BAL son parte del ecosistema intestinal y algunas cepas poseen propiedades probióticas. El objetivo de este trabajo fue evaluar calidad bacteriológica e identificación de bacterias ácido lácticas en queso arepero de Valle de la Pascua, Edo Guárico. Se recolectaron 20 muestras de queso, se evaluaron indicadores de calidad según normativa COVENIN 3821: aerobios mesófilos, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. Además se aislaron y caracterizaron las BAL. Se evaluó su potencial probiótico: 1) resistencia a pH ácido y sales biliares; 2) ensayo de adhesión a epitelio intestinal; 3) actividad bactericida y 4) susceptibilidad a antibióticos. La identificación molecular se realizó por PCR y secuenciación. Los indicadores de calidad excedieron los límites permitidos. Se identificaron por PCR y secuenciación las especies: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Weissella paramesenteroides* y *Pediococcus acidilactici*. Éstos exhibieron resistencia a un rango amplio de pH ácido y sales biliares excepto *Pediococcus acidilactici* que mostró resistencia solo a pH 3-4. Todos los aislados mostraron actividad bactericida, capacidad de adhesión a las células intestinales y susceptibilidad a antibióticos. Se concluye que aunque el queso arepero artesanal no cumple con la normativa de calidad, se identificaron aislados ácido lácticos con potencial probiótico que quizás actúen ejerciendo un efecto protector.

**Palabras clave:** Queso, calidad, probióticos.

## INTRODUCCION

La leche y el queso blanco son los lácteos más consumidos por la población venezolana, según datos de la Encuesta de Seguimiento al Consumo de Alimentos del Instituto Nacional de Estadística <sup>(1)</sup>, siendo los quesos artesanales ampliamente aceptados por su excelente sabor <sup>(2)</sup>. Los quesos artesanales venezolanos utilizan como materia prima leche cruda lo cual representa un riesgo de contaminación cuando no es manejada con las medidas sanitarias correctas. A pesar que existen evidencias de quesos arepero contaminados a través de diversos análisis microbiológicos, aún no se han reportado brotes infecciosos asociados a su consumo, razón por la que resulta necesaria la evaluación de la calidad bacteriológica de éstos. <sup>(3)</sup>

La fabricación de queso artesanal, carece de la aplicación de procesos y técnicas que aseguran la calidad sanitaria de la misma, como la pasteurización baja o alta, o los procesos de estandarización; es decir, parámetros higiénicos adecuados en su procesamiento y esquemas de fabricación empírico, no estandarizados, que en algunos casos en deficientes condiciones sanitarias pudieran significar riesgo para la salud <sup>(4)</sup>. Al respecto, un valioso aporte en esta área determinó que las bacterias ácido lácticas (BAL) son de gran importancia en la industria alimentaria para la conservación de la calidad y desarrollo de características sensoriales (textura, sabor, olor) en los alimentos que son atractivos para el consumo humano en todo el mundo. <sup>(5)</sup>

La calidad en relación a sus características (color, sabor, olor) es determinada entre otros factores por sus componentes bacterianos, especialmente BAL <sup>(2)</sup>, éstas forman un grupo de microorganismos que según diversos estudios contribuyen a determinar la calidad organoléptica de los quesos, además que bacterias de este grupo son componentes de la microbiota intestinal, de allí la importancia de su investigación. <sup>(2)</sup>

El municipio Leonardo Infante (Valle de la pascua), del Edo. Guárico se caracteriza por ser una región conocida a nivel nacional debido a su gran producción quesera, quesos elaborados principalmente de manera artesanal, que por su textura y delicioso sabor es un producto de amplia aceptación a nivel nacional con gran demanda en el mercado. Es relevante destacar que para la elaboración de los mismos se emplean técnicas ancestrales, sencillas y elementales, en las cuales suelen tener poco control de calidad en cuanto al manejo y procesamiento del queso.

La calidad de los alimentos es el conjunto de cualidades que estos poseen para hacerlos aceptables ante los consumidores; éstas cualidades incluyen tanto las percibidas por los sentidos (cualidades sensoriales): sabor, olor, color, textura forma y apariencia, como cualidades higiénicas y químicas. Constituye una de las exigencias principales en los procesos de manufactura alimentaria, debido a que el destino final de los productos es la alimentación humana y los alimentos son susceptibles a contaminación <sup>(6)</sup>. El queso es elaborado a partir de leche que proviene de ovejas, cabras, pero la mayor parte es de vaca y búfala. Para elaborar un buen queso es necesario utilizar leche de excelente calidad, que provenga de un animal sano y bien alimentado. <sup>(5)</sup>

La industria homogeniza y pasteuriza su materia prima mezclando la leche de distintas procedencias, en cambio la quesería artesanal, elabora queso con la leche natural y entera recién ordeñada del predio más cercano al productor, cuya alimentación refleja el paisaje de la zona. La pasteurización de la leche en los quesos industriales es fundamental para asegurar la producción de quesos que cumplan con los criterios de calidad según la normativa existente. La pasteurización suprime parte de la microbiota e inactiva componentes enzimáticos responsables de algunas cualidades, lo que afecta la calidad sensorial de estos, siendo los quesos artesanales una opción insuperable en sabor. <sup>(7)</sup>

La Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) 409:98, definen los criterios microbiológicos que se deben tener en cuenta en los alimentos para la detección y cuantificación de bacterias, definiendo el número de muestras defectuosas y límites considerados apropiados para el alimento o sus ingredientes. <sup>(8)</sup> El rango de unidades formadoras de colonias (UFC) en queso blanco en las normas COVENIN 3821:03 varía según el tipo de bacteria, en coliformes totales es de  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^3$  UFC/g, *Staphylococcus aureus*  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^3$  UFC/g, *Escherichia coli*  $< 10,0$  UFC/g, *Salmonella* spp 0 UFC/g <sup>(9)</sup>. Los microorganismos encontrados deben ser analizados aunque no rutinariamente y el incumplimiento de los límites establecidos para el número de muestras analizadas sirve para alertar al responsable del producto sobre la necesidad de identificar y corregir los factores causantes del problema. <sup>(8)</sup>

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común, estudiadas a principios del año 1919 por Orla-Jensen. Pertenecen al phylum Firmicutes que comprende alrededor de 20 géneros donde: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* son los principales miembros de este grupo, siendo *Lactobacillus* spp el más grande de estos géneros. <sup>(10)</sup>

En general son cocos o bacilos Gram positivos de longitud variable, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilicos o aerotolerantes; carecen de actividad respiratoria debido a una deficiencia enzimática (citocromo catalasa), contienen un grupo hemo, que les permite poner en marcha la cadena respiratoria, dado a esto son anaerobios tolerantes pudiendo formar colonias en medios sólidos en presencia baja de oxígeno, producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de los carbohidratos. <sup>(4)</sup> Las bacterias acidificantes contribuyen al

sabor, aroma, textura y el valor nutricional de los alimentos fermentados a través de la producción de exopolisacáridos (EPS) y modificación de proteínas.<sup>(10)</sup>

**Géneros de interés de las BAL:** *Lactobacillus* spp, *Weissella* spp y *Pediococcus* spp

**Especies de interés de *Lactobacillus*:** *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii*.

### **Probióticos**

Según la Organización Mundial de Gastroenterología, los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se ingieren en las cantidades adecuadas, pueden aportar beneficios para la salud de quien los consume. Nuestro sistema digestivo está colonizado por un grupo diverso de bacterias que forman parte de la llamada microbiota intestinal. Estas bacterias viven en simbiosis con nuestro intestino en un delicado equilibrio, al crecer en el intestino y adherirse a la mucosa intestinal, evitan que otras bacterias patógenas lo hagan, actuando como una barrera que evita la colonización del intestino por microorganismos patógenos. Sin embargo, los beneficios de los probióticos deben estudiarse en cada género, especie y cepa, los beneficios no deben extrapolarse ya que incluso dentro del mismo género y especie, las cepas bacterianas pueden tener distinta capacidad probiótica y diversas funciones.<sup>(11)</sup> Las bacterias del género *Lactobacillus* spp comensales del tracto gastrointestinal del humano, producen ácido láctico, como producto metabólico de la digestión de carbohidratos no digeribles (polisacáridos, oligosacáridos). El ácido láctico, disminuye el pH en el intestino creando un ambiente donde otras bacterias y algunas potencialmente patógenas no puedan crecer y desarrollarse.<sup>(12)</sup>

Los probióticos constituyen uno de los componentes más destacados dentro de los alimentos funcionales, que son alimentos modificados cuyo fin, es ejercer un efecto beneficioso sobre la salud del huésped por medio de la modificación y estabilización de la microflora. <sup>(12)</sup> Los probióticos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo y son también conocidos como: bioterapéuticos, bioprotectores, bioprofilácticos, siendo, el consumo de derivados lácteos el principal vehículo de ingestión de probióticos en la actualidad para los humanos. <sup>(13)</sup>

Como consecuencia de la creciente preocupación de la sociedad por una alimentación más saludable, se han introducido en el mercado una gran cantidad de alimentos y suplementos con probióticos, por ello se establecieron criterios de selección que pueden ser considerados controles de calidad para éstos. <sup>(12)</sup> Los criterios se enumeran a continuación:

**1) Adhesión a células epiteliales intestinales:** La capacidad de adhesión a componentes de la mucosa gastrointestinal es considerada como una propiedad fundamental para la colonización y para manifestar los efectos beneficiosos sobre la salud que proveen los probióticos en su interacción con el huésped. <sup>(14)</sup> Para evaluar esta capacidad se utiliza actualmente, células epiteliales intestinales derivadas de carcinoma de colon (ej: CACO-2 y HT-29). <sup>(15)</sup> Con el crecimiento hacia confluencia dejan de proliferar, desarrollando monocapa de células polarizadas con un fenotipo absorptivo, en el cual destaca la presencia de un borde en cepillo mejor definido que en poblaciones diferenciadas de HT-29. <sup>(16)</sup>

**2) Producción de compuestos antimicrobianos:** El fenómeno de antagonismo se basa generalmente en la producción de sustancias que inhiben o inactivan con mayor o menor especificidad a otras bacterias relacionadas o no taxonómicamente. Dentro de las sustancias antimicrobianas, éstas pueden ser, además de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y reuterina. <sup>(15)</sup>



**3) Tolerancia a ácido y a las sales biliares:** Para que un probiótico pueda ejercer los efectos beneficiosos esperados debe mantenerse viable durante el tránsito por el tracto gastrointestinal (TGI). Esto implica la exposición a la acidez del estómago, al efecto tóxico de las sales biliares y a las enzimas gástricas y pancreáticas, lo que representa un obstáculo para las bacterias. Esta propiedad de resistencia al TGI puede evaluarse mediante ensayos *in vitro* o mediante modelos más complejos que simulan el proceso dinámico de la digestión. <sup>(15)</sup>

**4) Susceptibilidad a antibióticos de interés clínico:** Como en el caso de cualquier bacteria, entre estas algunas BAL, incluidos probióticos, existe una resistencia natural a diversos antibióticos. Esta resistencia puede estar relacionada con genes localizados en el cromosoma, o elementos extracromosomales (Ej: plásmidos o transposones). Cuando se procede a la selección de cepas probióticas, se recomienda que estas no contengan genes asociados a resistencia que puedan ser adquiridos por transferencia horizontal. <sup>(17)</sup>

### **Importancia de las Bacterias Probióticas**

El consumo de especies probióticas ya sea a través de productos lácteos fermentados o como inóculos de células vivas liofilizadas como suplemento de otros productos alimenticios, ha sido asociado con muchos beneficios para la salud en humanos. Algunos de esos incluyen efectos benéficos contra enfermedades del tracto gastrointestinal. <sup>(13)</sup>

- Modulación del sistema inmunológico
- Efectos Antitumorígenicos y Anticarcinogénicos
- Intolerancia a lactosa
- Disminución de colesterol sérico
- Disminución de la Hipertensión

Es por todo lo expuesto anteriormente que el presente estudio se ha basado en la comparación de diversos estudios de investigación previos que sirvan de base referencial sobre la evaluación de la calidad de quesos artesanales y el aislamiento de potenciales bacterias probióticas.

Reséndiz M.R., *et al.* (2012), en Tuzapan México, en su trabajo de investigación “El queso fresco artesanal de la canasta básica y su calidad sanitaria”, evaluó la calidad sanitaria del queso fresco artesanal a través de técnicas de bacteriología convencional, basándose en el recuento de coliformes totales, coliformes fecales, *Staphylococcus aureus*, además de la detección de *Salmonella* spp. Los resultados mostraron un elevado número de coliformes totales y coliformes fecales, en los diferentes sitios de elaboración del queso fresco. La presencia de estas bacterias en un nivel mayor a lo establecido, evidencia que el queso no se produce bajo ningún control sanitario y que en su elaboración no hubo tratamiento térmico de la materia prima. <sup>(18)</sup>

A su vez, Lezcano M, *et al* (2012), en Paraguay, en el artículo “Microbiología de quesos artesanales de la ciudad de Encarnación, Itapúa, Paraguay”, realizó la evaluación microbiológica de los quesos de elaboración artesanal a partir de 30 muestras obtenidas de los comercios de la ciudad de Encarnación de forma aleatoria. En este estudio se realizó la cuantificación de coliformes totales y fecales, *Staphylococcus* coagulasa positivo y detección de la presencia de *Salmonella* spp, *Shigella* spp y *Pseudomonas* spp, los resultados de las muestras analizadas reportaron cargas elevadas de coliformes totales y fecales. Los resultados demostraron que la calidad microbiológica de los quesos no se encontró en correspondencia con lo establecido por las normas. <sup>(19)</sup>

En los quesos artesanales además de evaluar la calidad, se han identificado géneros y especies de BAL de interés biotecnológico o que cumplan con criterios

para ser consideradas probióticas. Un estudio realizado por Martínez V, *et al.* (2012), en México, titulado “Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas de queso de hebra”. Se analizaron treinta (30) muestras de quesos, de las cuales se aislaron veinte (20) cepas, con predominio de los géneros *Lactococcus* spp. seguido en orden descendente por *Lactobacillus* spp, *Leuconostoc* spp y *Streptococcus* spp. Se concluyó que el queso de hebra podría ser una fuente para el aislamiento de bacterias ácido lácticas. <sup>(20)</sup>

Por su parte Jensen H, *et al.* (2012), en su investigación de “Pruebas *in vitro* de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico” cuyo objetivo fue evaluar, la diversidad de bacterias ácido lácticas probióticas, comercialmente disponibles de cultivos iniciales y otras potencialmente probióticas aisladas de humanos o alimentos, usando ensayos comunes como, la tolerancia al pH del tracto gastrointestinal, la capacidad de adhesión a células intestinales humanas y el efecto sobre la función de la barrera epitelial. Las bacterias seleccionadas fueron *Lactobacillus plantarum* (WCFS1, NC8, 299v, MF1298, AD2), *Lactobacillus pentosus* (MF 1300), *Lactobacillus farciminis* (MF 1318), *Lactobacillus sakei* (LB 790,23k, MF 1053, LS 25), *Lactobacillus gasseri* (ATCC 33323), *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103), *Lactobacillus reuteri* (DSM 20016, DSM 17938, ATCC PTA6475fj1, ATCC PTA5289) y *Pediococcus pentosaceus* (Q3). Las cepas de *L. reuteri* (DSM 20016, DSM 17938, ATCC PTA6475fj1, ATCC PTA5289) y *P. pentosaceus* (Q3) toleraron el medio que simulaba las condiciones de las secreciones gástricas. *L. pentosus* (MF 1300), *L. farciminis* (MF 1318) y *L. sakei* (LB 790,23k, MF 1053, LS 25) perdieron su viabilidad en un tiempo de 180 min luego de su exposición. Todas toleraron la acción por un tiempo limitado de secreciones intestinales. En cuanto a la capacidad de adhesión bacteriana a células intestinales humanas, este estudio reveló que las cepas *L. plantarum* (WCFS1, NC8,299v, MF1298, AD2) y *L. reuteri* (DSM 20016, DSM 17938, ATCC PTA6475fj1, ATCC PTA5289) exhibieron una mayor capacidad de adhesión en comparación con las otras cepas. Éstas presentaron pocos efectos sobre la

función de la barrera epitelial. *L. reuteri* (DSM 20016, DSM 17938, ATCC PTA6475fj1, ATCC PTA5289) mostró interesantes características en comparación con las otras cepas investigadas al cumplir mayor número de los criterios evaluados. (21)

El queso se conoce como el producto de la maduración de la cuajada procedente de la acidificación de la leche entera, de la nata o de la leche parcial o totalmente desnatada, cada tipo de queso presenta una serie de características físicas, químicas y microbiológicas que dependen en gran medida de la composición de la leche empleada en su elaboración. (5) La importancia del queso como alimento, en Venezuela y en todas las sociedades, radica en que representa una forma de consumo indirecto de leche y su aporte de nutrientes así como sus componentes bacterianos. (22)

En Venezuela, el queso arepero es expandido sumergido en suero y es elaborado por pequeños productores en queseras artesanales, ubicadas en varios estados del país. En el estado Guárico ni en ningún estado de Venezuela se ha reportado brotes por el consumo de queso arepero, siendo un producto de consumo masivo en el país. Resultando necesaria la realización de estudios que permitan evaluar la calidad bacteriológica de este queso así como identificar sus componentes bacterianos (bacterias ácido lácticas) que determinen su excelente calidad organoléptica.

En atención a la problemática expuesta, este trabajo, se considera novedoso en vista de las pocas investigaciones realizadas en el país y una vez ejecutado aportará conocimientos científicos que sirvan de soporte para la apertura de un nuevo campo de investigación que le brinde elementos que sirvan a la industria alimentaria para el impulso de estrategias biotecnológicas para la producción de quesos de excelente calidad organoléptica y que sean inocuos para la salud humana.

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **Objetivo General**

Evaluar la calidad bacteriológica e identificación de bacterias ácido lácticas en queso arepero de Valle de la Pascua, Estado Guárico 2015-2016.

### **Objetivos Específicos**

- Comprobar la calidad bacteriológica de aerobios mesófilos, coliformes termotolerantes, coliformes totales, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, de las muestras de queso arepero obtenidas de queseras de acuerdo a los parámetros establecidos en la Norma COVENIN 3821 para quesos.
- Aislar con técnicas de bacteriología clásica bacterias lácticas de las muestras de queso arepero según las normas COVENIN 1126:89.
- Identificar las bacterias ácido lácticas presentes en las muestras obtenidas de queso arepero haciendo uso de bacteriología clásica, PCR simple, PCR múltiple y secuenciación.
- Evaluar los criterios en aislados de bacterias ácido lácticas para ser consideradas probióticas

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta fue una investigación aplicada, descriptiva, de tipo experimental con diseño de corte transversal, las muestras se obtuvieron de cuatro (04) queseras productoras de queso arepero del Municipio Leonardo Infante de Valle de la Pascua, Edo. Guárico, se recolectaron 12 muestras de queso arepero en el mismo día de su producción para la calidad bacteriológica de los mismos y 20 muestras para la identificación de las BAL, dos unidades de queso por mes, en envases plásticos manipulados por el personal, las cuales luego de ser adquiridas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el momento en que se les realizó los procesos y análisis correspondientes dentro de las primeras veinte y cuatro (24) horas, tomando en cuenta las medidas sanitarias para el manejo de las mismas. Aquellas muestras refrigeradas o que permanecieron a temperatura ambiente por más de cuarenta y ocho (48) horas no fueron incluidas en el estudio ya que el mayor consumo de este tipo de queso en la región es ingerido sin refrigeración.

**Procesamiento de la muestra para control de calidad bacteriológica.** Según lo establecido por la normativa nacional COVENIN 1126:89, se pesaron 10 g de cada muestra de queso arepero, se homogenizaron en 90 mL de agua peptonada estéril al 0,1%, esto correspondió a la dilución 1/10. Se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una dilución final de  $1/10^{-5}$ . Se tomaron 2 diluciones que permitieron obtener colonias aisladas para el recuento de las mismas ( $1/10^{-3}$  y  $1/10^{-5}$ ) y se procedió a realizar por duplicado un vertido en placa para aerobios mesófilos en agar dos de Reasoner “R<sub>2</sub>A”, para coliformes totales en agar biliado-rojo neutro-cristal violeta “VRBA”, agar azul metileno levine eosina “EMB levine” para *Escherichia coli*; y un vertido por superficie para *Staphylococcus aureus* en agar Baird-Parker. Posteriormente se incubó de 24-48 horas a 37<sup>0</sup>C. Luego transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a contar el número de colonias crecidas en medios selectivos.

Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de queso denotados en notación científica conservando solo un decimal.<sup>(23)</sup>

**Procesamiento de la muestra para determinar la presencia de *Salmonella*.**

Partiendo de las normas COVENIN 1126:89, se pesaron 25 g de cada muestra de queso arepero y cada una se añadió en 225 mL de caldo lactosa estéril (caldo pre-enriquecido) que correspondió a una dilución 1/10. Se incubó 24 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo se colocó 1 mL del preparado en 9 mL de caldo de tetracionato (medio enriquecido), y se incubó 24 horas a 37 °C. Luego se procedió a la estriación en los medios correspondientes para la identificación de *Salmonella* (Agar *Salmonella-Shigella* “SS”, Agar verde brillante “VB”). El sembrado se realizó por duplicado. Se incubó de 24-48 horas a 37 °C. Posteriormente se verificó el número de colonias crecidas en medios selectivos y a través de medios automatizados se determinó si las colonias crecidas pertenecían al género *Salmonella*.<sup>(23)</sup>

**Procesamiento de la muestra para el aislamiento y preservación de las bacterias ácido lácticas.**

En una cabina de bioseguridad clase II, se pesó 1g de cada muestra de queso arepero, el mismo se vertió en un mortero de acero inoxidable estéril, se trituró y se le añadió 9 mL de agua peptonada estéril, se homogenizó y este homogenizado correspondió a una dilución 1/10. De esta dilución se tomó 100 µl y se vertió en la superficie de placas agar Rogosa o agar Man Rogosa Sharpe “MRS” y con una espátula de drigalski se distribuyó uniformemente por toda la placa. Posteriormente las placas se pusieron en un ambiente microaerófilico y se incubaron de 24-48 horas a 37 °C. Así mismo, las colonias crecidas presuntivas (blanquecinas y de apariencia cremosas), se visualizaron en un microscopio de contraste de fase, seleccionando solo los bacilos y los cocos presuntivos de *Pediococcus* spp (en pares o tétradas). Luego se procedió a realizar un respaldo de cada una de las colonias puras (solo bacilos) en una placa dividida en una cuadrícula entre 10-14 cuadros y con un asa de platino se rayaron en cada uno, una colonia distinta en agar Rogosa o agar MRS (procedimiento

que se realizó en un ambiente estéril), nuevamente se incubó en condiciones de microaerofilia de 24-48 horas a 37 °C. De las colonias puras resultantes se procedió a inocular en MRS medio líquido y se incubó de 24-48 horas a 37 °C. Posteriormente del crecimiento del caldo, se verificó en microscopio de contraste de fase (LEICA DM2000), una vez corroborado que el cultivo estaba puro, se preservó en tubos estériles de 2mL denominados crioviales, con una concentración final de 50% glicerol y se almacenó en ultracongelador a -80 °C. <sup>(23)</sup>

**Extracción de ADN por método físico de ebullición (*Boilings*).** En el caso de las bacterias aisladas con los procedimientos de bacteriología clásica, estas se inocularon en medio líquido LB y fueron crecidas e incubadas a 37°C hasta saturación. Se tomó 1,5 mL del medio LB y se llevó a centrifugación 14000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento de células obtenido fue resuspendido en 300 µL de agua ultra pura (Mili-Q). Luego se aplicó el método físico de ebullición para lisis celular, se sometió a ebullición por 10 minutos. Todos los pasos de centrifugación fueron realizados en una centrifuga, marca Eppendorf modelo 5417R.

A partir del cultivo puro de cada aislado se tomó una alícuota de un 1 mL del cultivo en un tubo estéril de 1,5 mL, se centrifugó a 14000RPM en una microcentrifuga marca Eppendorf modelo 5417R por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y dependiendo de la cantidad de sedimento fue resuspendido en 0,2 mL o 0,5 mL de agua destilada ultra pura estéril. Esta suspensión de células bacterianas fue sometida a ebullición por 10 minutos y finalmente se preservaron a -20 °C hasta el momento de su procesamiento. <sup>(24)</sup>

**Reacción en cadena de la polimerasa “PCR” y electroforesis.** Se emplearon oligonucleótidos género-específicos para la identificación de bacterias del género *Lactobacillus* spp y otras BAL como *Leuconostoc* spp, *Weissella* spp y *Pediococcus* spp. Además de oligonucleótidos especie-específicos para *Lactobacillus fermentum*,



*Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. La secuencia de oligonucleótidos utilizados, la región o el gen en que detectan y el tamaño esperado de los fragmentos son detallados en la tabla 1. <sup>(2)</sup>

La reacción de PCR estuvo compuesta por: Buffer 5X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 200 μM, oligonucleótidos en cantidades equimolar 0,2 μM, 1U de Kapa ADN polimerasa (Kapa Biosystems). Las condiciones del PCR fueron: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto, finalmente 72°C por 10 minutos. Todos los PCR se realizaron por triplicado. Los ensayos se realizaron en un volumen de reacción total de 12,5μL. el termociclador utilizado para la realización de la PCR fue de marca Eppendorf modelo N° 5345. <sup>(2)</sup>

Los productos de la amplificación por PCR fueron visualizados en una corrida electroforética horizontal en gel de agarosa de 1,2% a 1,5%. La corrida electroforética se realizó en buffer Tris-Borato-EDTA 1X (TBE) (TBE 5X: 250mM tris-HCl; 300 mM de ácido bórico; 5 mM de EDTA, pH=8), entre 80 y 120 voltios, en una cámara para electroforesis durante 45 minutos a temperatura ambiente. En cada pozo del gel se cargó un volumen del producto de PCR no mayor al 25% de la reacción total. <sup>(2)</sup>

Para su visualización los geles fueron teñidos con agentes fluorescentes que se unen al ADN SYBR green (INVITROGEN) y Diamond (PROMEGA) en una dilución final de 1:5000 y 1:10000 en TBE respectivamente. Las bandas de ADN fueron visualizadas bajo luz UV en un transiluminador de geles (UVITEC Cambridge). Las imágenes fueron captadas con una cámara digital adaptada al mismo equipo y de la misma marca, procesadas con el programa Alliance LD2 gel Imaging System. <sup>(2)</sup>

**Tabla 1:** Oligonucleótidos utilizados en este estudio

<b>Especies bacterianas</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Gen</b>	<b>Tamaño esperado (pb)</b>	<b>Ref</b>
<i>Lactobacillus</i> spp <i>Leuconostoc</i> spp <i>Pediococcus</i> spp. <i>Weissella</i> spp	F:GCTTGTGTTCTGAGGGAAGC R:CTTTCTTCTGCACCGTATCCA	16S rDNA	577 pb	(25)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	F:GGCGGGGAAAGAGGTAACTA R:TGACGCAAACCTAATGAACCA	<i>prtH</i>	509 pb	(2)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	F:GGAAGACTCCGTTTTGGTCA R:AGTTCAAGTCTGCCCCATTG	<i>lacZ</i>	395 pb	(2)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	F:TGCCAAGCTCTACTCCGTTT R:GTCAAGCGGCATAGTGCAA	<i>dppE</i>	217 pb	(2)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	F:CCAGATCAGCCAACTTCACA R:GGCAAACCTTCAAGAGGACCA	<i>Arginine-ornitine antiporter</i>	310 pb	(2)

### **Determinación de criterios en las bacterias ácido lácticas para ser consideradas probióticas.**

**Resistencia a pH ácido y sales biliares.** Para la resistencia a pH se preparó caldo MRS a distintos pH, pH 1, pH 2 y pH 3 (para los aislados con morfología de bacilos y cocos), pH 3.5, pH 4 y pH 4.5 (para los aislados con morfología de cocos), para ajustar el pH se utilizó una solución HCL al 1N; para sales biliares se preparó caldo MRS al 0,3% de bilis porcina. Los aislados se inocularon en caldo MRS y se

incubaron durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente en una placa estéril de 96 pozos se inoculó por triplicado 180 µl del medio (MRS, MRS pH 1, MRS pH 2, MRS pH 3, MRS pH 3.5, MRS pH 4, MRS pH 4.5 y MRS 0,3 % bilis) y 20 µl del cultivo fresco de cada aislado, se incubaron a 37 °C y se realizaron mediciones de DO<sub>600nm</sub> en un espectrofotómetro (Biotek Synergy HT) a diferentes tiempos de incubación 0 horas, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 8 horas para evaluar la tasa de crecimiento (DO final ≥ 2 horas – DO inicial 0 horas); y así determinar la resistencia a los distintos pH ensayados y sales biliares. <sup>(26)</sup> Procedimiento que se realizó por triplicado.

**Capacidad de adhesión a la línea celular intestinal HT-29.** Se cultivaron en MRS líquido cada aislado hasta alcanzar una DO<sub>650nm</sub>: 0,5A. Luego se centrifugó 1 mL de cada cultivo por 5 minutos a máxima velocidad para obtener el sedimento de células de cada aislado, los cuales fueron resuspendidos en medio F12 sin antibiótico, sin antimicótico y sin suero. Posterior a esto se procedió a inocular 1 mL de la suspensión bacteriana en la monocapa de la línea celular HT29 (Confluencia: 100%), se incubó durante 1 hora a 37 °C, se practicaron 3 lavados con buffer fosfato salino (PBS), en el tercer lavado se desprendió mecánicamente la monocapa de la línea celular, y se realizaron diluciones seriadas de la suspensión de células en MRS líquido hasta 10<sup>-5</sup>. Se inoculó 100 µL de cada una de las diluciones 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> en agar MRS, se incubaron en condiciones de microaerofilia de 24-48 horas a 37 °C, se determinó las UFC. <sup>(27)</sup> Procedimiento que se realizó por triplicado.

**Susceptibilidad a antibióticos.** Se empleó la prueba de difusión en agar recomendada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards en agar MRS-Mueller Hinton (1/3 parte), partiendo de un cultivo fresco y discos de antibióticos, <sup>(28)</sup> estas placas se incubaron en condiciones de microaerofilia de 24-48 horas a 37 °C y se determinó la susceptibilidad a antibióticos midiendo el halo de inhibición, se considera susceptible un halo mayor o igual a 5 mm <sup>(29)</sup>. Los

antibióticos a evaluar fueron ampicilina (AP10), vancomicina (VA30), gentamicina (GM10) y ciprofloxacina (CIP5). Procedimiento que se realizó por triplicado.

**Actividad Bactericida.** En condiciones de esterilidad, se utilizó como agar base MRS agar al 0,2 % de glucosa, sobre este se inoculó una gota de 3  $\mu$ l de cada aislado, se incubó en condiciones de microaerofilia durante 48 horas a 37 °C, hasta que fuese visible el crecimiento (spot), para luego servir sobre estos el top agar. El top agar se preparó en un tubo de 15 mL al que se le añadió 100  $\mu$ l de un cultivo fresco puro de *S. entérica* (donada por el Instituto Nacional de Nutrición) o *E. coli* 0157:H7 (CVCM 0417) con 7 mL de LB agar al 0,7% (40 °C), fue vertido sobre el agar base con los “spots” y se incubó por 48 horas a una temperatura de 37°C. Posteriormente se determinó la actividad bactericida por la presencia de un halo de inhibición mayor o igual a 5mm. <sup>(27)</sup> Procedimiento que se realizó por triplicado.

**Análisis de datos.** Los datos obtenidos en el control de calidad bacteriológica en las muestras de queso arepero fueron procesados mediante estadística descriptiva (media geométrica) expuesta a través de tablas. La caracterización fenotípica de *Salmonella* spp. se realizó en un equipo automatizado Vitek II y confirmación serológica a través de antígenos polivalentes específicos para el género. Los resultados de la identificación de las bacterias ácido lácticas fueron procesados a través de la corrida electroforética de la amplificación del gen *rrs* del ARNr 16S, además, la secuenciación de las bases nucleotídicas de las cepas en estudio por medio de la alineación realizada en NCBI BLAST y a través de la imagen de la corrida electroforética por PCR con oligonucleótidos especie-específicos. Así mismo, la actividad bactericida y susceptibilidad a antibióticos fueron reflejados mediante métodos cuantitativos, en la resistencia a pH y sales biliares se calculó la  $\Delta DO_{630nm}$  (DO<sub>f</sub>-DO<sub>i</sub>) expuesta por medio de gráficas y en la adhesión a células epiteliales de la línea celular HT29 se contaron unidades formadoras de colonias presentadas en tablas.

## RESULTADOS

**Control de calidad bacteriológica.** La media geométrica para el recuento de aerobios mesófilos fue de  $5,2 \times 10^4$  UFC/g con un alto porcentaje de las muestras con valores superiores a  $10^5$  UFC/g (Tabla 2). La media geométrica para coliformes totales se ubicó en  $5,2 \times 10^4$  UFC/g siendo su valor máximo mayor a  $10^5$  UFC/g en el 58% de las muestras (Tabla 2). Conjuntamente *Escherichia coli* presentó una media de  $1,3 \times 10^4$  UFC/g, exhibiendo un valor máximo de  $10^5$  UFC/g en una única muestra (Tabla 2). Por su parte el recuento de *Staphylococcus aureus* fue de 0 UFC/ presentado un alto valor de  $10^5$  UFC/g en una sola muestra (Tabla 2). A su vez en las 12 muestras el recuento de *Salmonella* spp fue de 0 UFC/g (Tabla 2). Del total de muestras analizadas (12), el 100% de las mismas estuvo fuera de especificación para los indicadores sanitarios, aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*, el 92% de las muestras en estudio estuvieron dentro de los parámetros establecidos para *S. aureus* y para *Salmonella* spp la totalidad de las muestras se encontraron dentro de los parámetros establecidos por las normativa nacional.

**Tabla2.** Indicadores de calidad bacteriológica en muestras de queso arepero de Valle de la Pascua, Edo. Guárico.

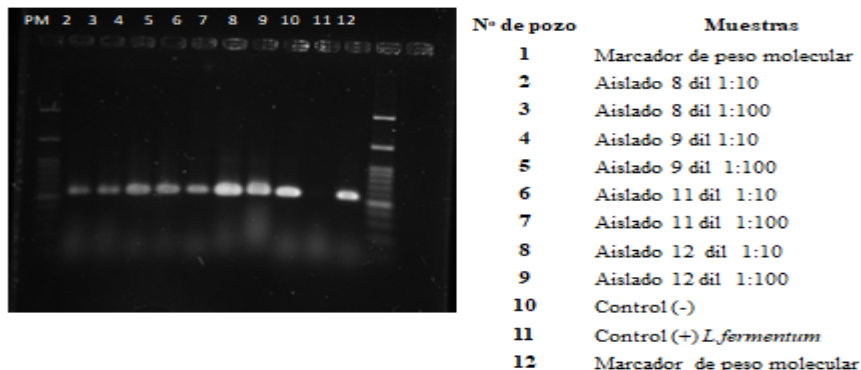
Microorganismos	Media geométrica UFC/g
Aerobios mesófilos	$5,16E+04 \times 10^4$
Coliformes totales	$5,19E+04 \times 10^4$
<i>Escherichia coli</i>	$1,31E+04 \times 10^4$
<i>Staphylococcus aureus</i>	0
<i>Salmonella</i> spp.	0

**Fuente:** Datos de la investigación

**Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas (BAL).** Se procesaron 20 muestras de queso arepero de las cuales se obtuvieron 26 aislados (en algunas muestras se obtuvieron 2 aislados), éstos presentaron características propias de bacterias ácido lácticas en relación a su morfología (según lo observado por microscopia de contraste de fases) bacilos y cocos no motiles, capaces de crecer en condiciones microaerofílicas con el desarrollo de colonias de aspecto cremoso y color blanquecino.

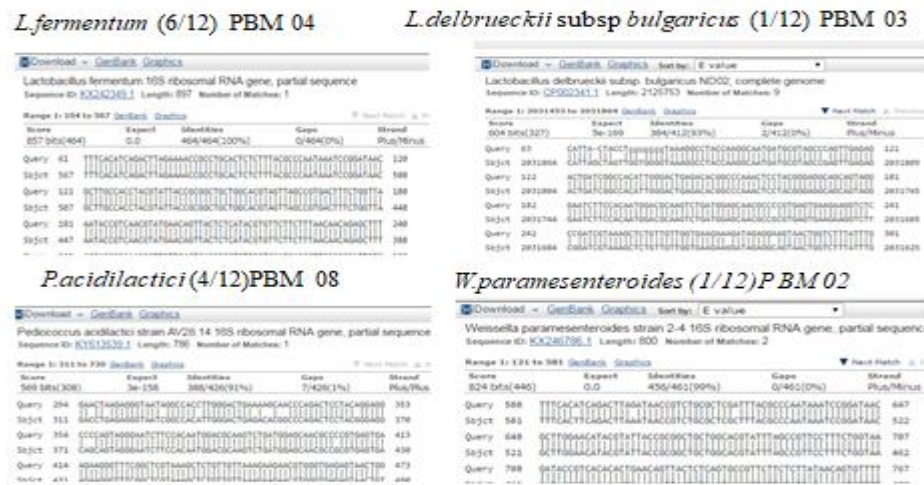
**Identificación de las BAL por PCR simple y secuenciación de ADN.** Los productos de la amplificación del gen *rrs* del ARNr 16S de los veinte y seis aislados presuntivos de *Lactobacillus* spp, se enviaron doce a secuenciación de las bases nucleotídicas para su identificación, en la unidad de estudios genéticos y forenses IVIC (UEGF-IVIC), dónde, seis correspondían a *Lactobacillus fermentum*, cuatro a *Pediococcus acidilactici*, uno *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, uno *Weissella paramesenteroides*. Los ocho aislados restantes no enviados a secuenciación se identificaron por PCR con oligonucleótidos especie-específicos como *Lactobacillus fermentum*.

**Imagen1.** Corrida electroforética de la amplificación del gen *rrs* del ARNr 16S



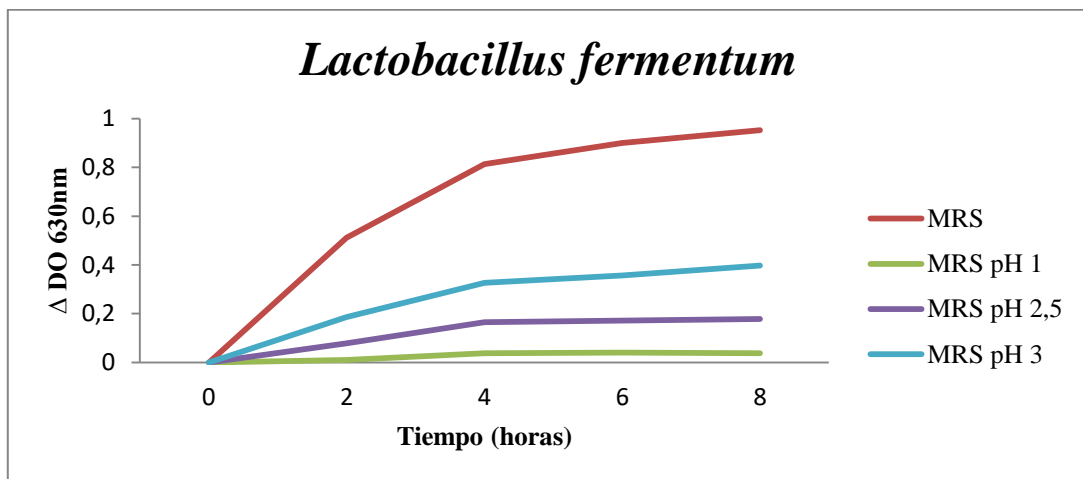
Fuente: Datos de la investigación

**Imagen2.** Alineación de la secuenciación de bases nucleotídicas para la identificación de la especie de las cepas en estudio.

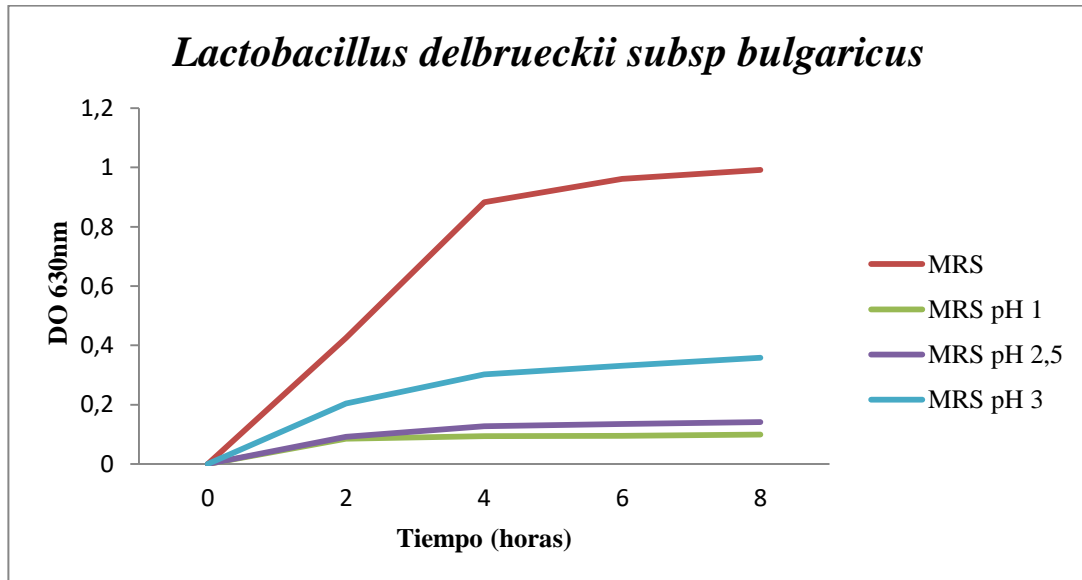


**Fuente:** Datos de la investigación

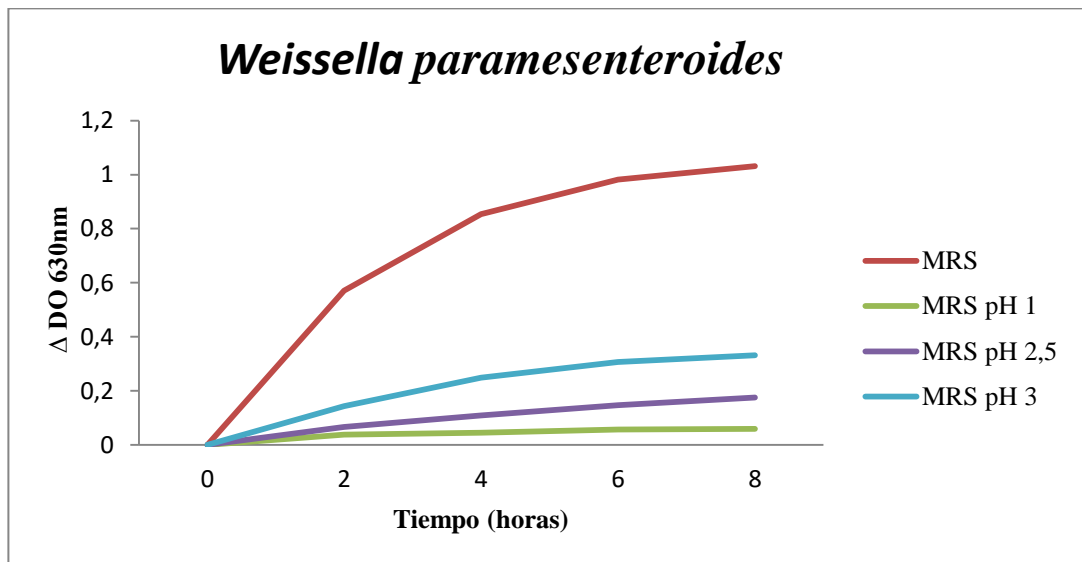
**Resistencia a pH.** Las cepas de *L. fermentum* PBM04, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* PBM03 y *W. paramesenteroides* PBM02, a pesar de presentar un descenso en su tasa de crecimiento con respecto al control, luego de 8 horas de incubación resistieron a todos los pH ensayados. *P. acidilactici* PBM08, no mostró crecimiento en MRS pH 1 y pH 2,5 luego de 8 horas de incubación. (Gráfica 1, 2, 3, 4)



**Gráfica 1.** Ensayo de resistencia a pH ácido de *Lactobacillus fermentum* PBM04.

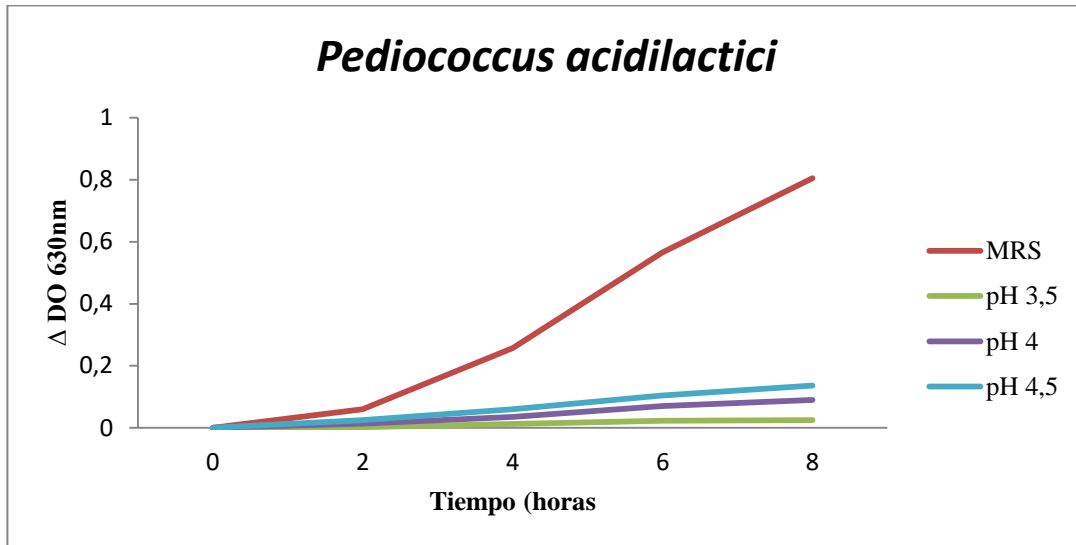


**Gráfica 2.** Ensayo de resistencia a pH ácido de *L. delbrueckii subsp bulgaricus* PBM03.



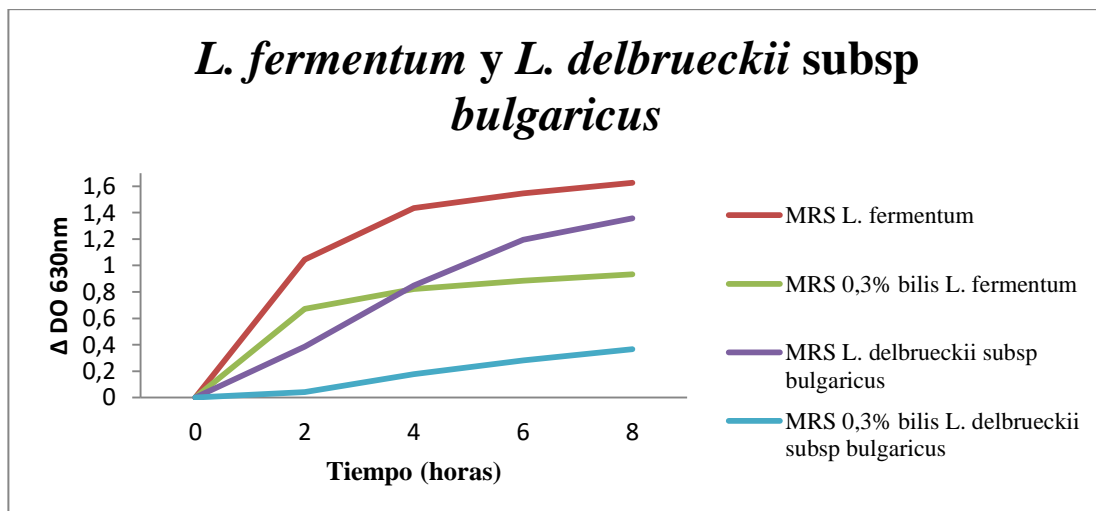
**Gráfica 3.** Ensayo de resistencia a pH ácido de *Weissella paramesenteroides* PBM02.



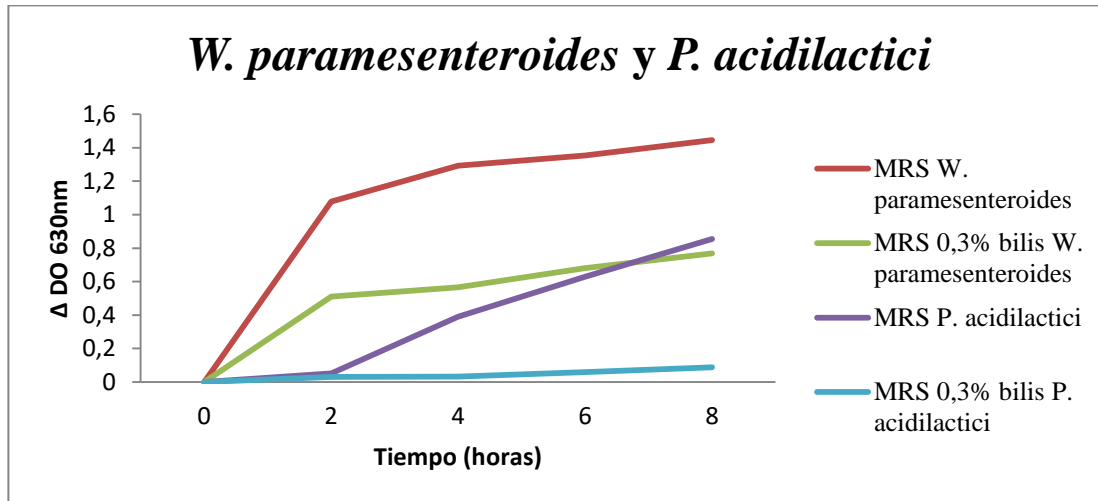


**Gráfica 4.** Ensayo de resistencia a pH ácido de *Pediococcus acidilactici* PBM08.

**Resistencia a sales biliares.** Todas las cepas evaluadas en presencia de 0,3% de sales biliares exhibieron una tasa de crecimiento semejante a las cepas en condiciones óptimas de crecimientos. Sin embargo se observó que las cepas de *P. acidilactici* no resistió el ensayo. (Gráfica 5 y 6)



**Gráfica 5.** Resistencia a sales biliares de *L. fermentum* PBM04 y *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* PBM03.



**Gráfica 6.** Resistencia a sales biliares de *W. paramesenteroides* PBM02 y *P. acidilactici* PBM08

**Capacidad de adhesión a la línea celular intestinal HT29.** Las cepas demostraron una capacidad de adhesión a la línea celular HT29 significativa con un conteo  $\geq 10^6$  UFC/g en ambas diluciones. (Tabla 3)

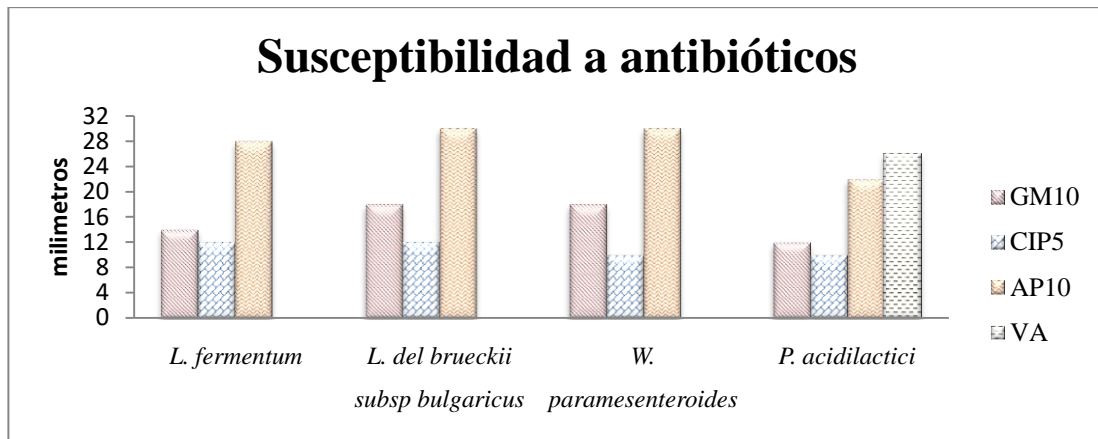
**Tabla 3.** Capacidad de adhesión a la línea celular intestinal HT29 a través de las UFC en las diluciones de  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ .

Aislado	$10^{-3}$ UFC/g	$10^{-4}$ UFC/g
<i>L. fermentum</i> PBM04	$1,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$
<i>L. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> PBM03	$5,7 \times 10^6$	$8,9 \times 10^6$
<i>W. paramesenteroides</i> PBM02	$4,6 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$
<i>P. acidilactici</i> PBM08	$4,5 \times 10^6$	$9,1 \times 10^6$

**Fuente:** Datos de la investigación.

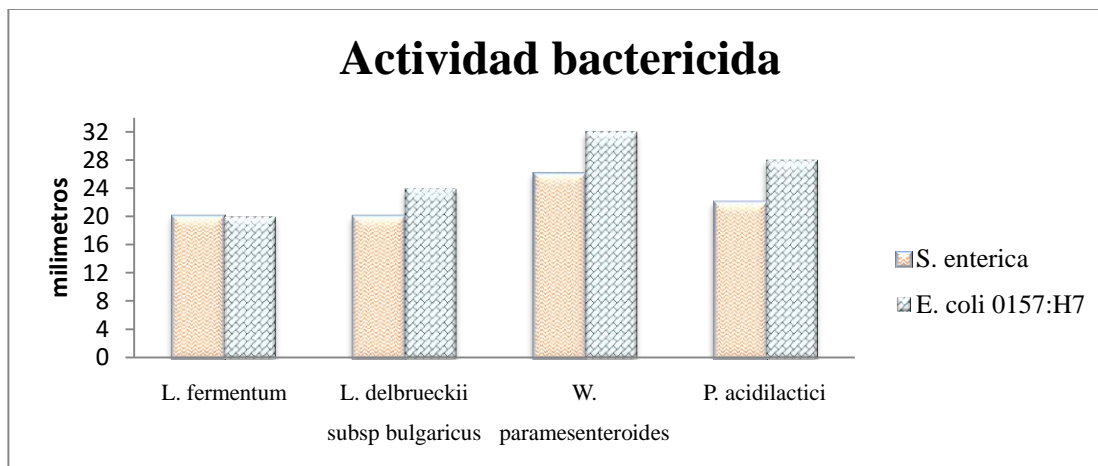
**Susceptibilidad a antibióticos.** Se observó que todas las cepas presentan sensibilidad frente a los antibióticos evaluados Gentamicina (GM10), Ciprofloxacina (CIP5) y Ampicilina (AP10). Además, *P. acidilactici* PBM08 mostró sensibilidad frente a

Vancomicina (VA30), mientras que *L. fermentum* PBM04, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* PBM03 y *W. paramesenteroides* PBM02, exhibieron resistencia a este antibiótico, dónde ha sido descrita la existencia de una resistencia intrínseca. (Gráfica 7)



**Gráfica 7.** Resultados de susceptibilidad a antibióticos en base a un halo de inhibición  $\geq 5$ mm.

**Actividad bactericida.** Se obtuvieron halos de inhibición sin el crecimiento de colonias de *S. entérica* y *E. coli* 0157:H7 alrededor de los “spots” de cada cepa tomando en cuenta aquellos con un diámetro mayor a 5 mm. (Gráfica 8)



**Gráfica 8.** Actividad bactericida de cada aislado sobre *E. coli* 0157:H7 y *S. enterica*

## DISCUSIÓN

Al evaluar el control de calidad de queso arepero (artesanal), se observó que todas las muestras salen de los parámetros de la normas COVENIN 3821:03 excepto para *Salmonella* spp, esto parece estar relacionado con una inadecuada manipulación o la evidencia que el queso no se produce bajo ningún control sanitario. Reséndiz M.R., *et al.* (2012), tuvieron resultados similares con carga bacteriana elevada de los quesos frescos artesanales de la canasta básica. La elevada carga microbiana en las muestras de queso analizadas refleja deficiencias higiénicas en la manipulación del queso que se comercializa en los mercados estudiados en Tuzapan, México <sup>(18)</sup>, lo cual representa un riesgo para la salud del consumidor. Por consiguiente, los resultados y la manipulación en la elaboración del queso se asemejan a la información obtenida en la presente investigación.

En la actualidad, hay una gran diversidad de productos que poseen dentro de su composición bacterias probióticas en el mercado, aunque los de mayor aceptación son lo derivados lácteos, especialmente el yogurt y las leches fermentadas. El queso es un producto derivado de la fermentación de la leche mediada por sus componentes bacterianos principalmente las bacterias ácido lácticas. Uno de los propósitos de esta investigación fue el aislamiento de las BAL. La caracterización se hizo con una combinación de las pruebas morfológicas, metabólicas, fisiológicas y por métodos moleculares, que estuvieron basados en la secuenciación del gen *rrs* ARNr 16s. Se identificaron 4 tipos diferentes de BAL, a los cuales se les evaluaron criterios para ser considerados probióticos. Ramos B., *et al.* (2009), obtuvo como resultado de secuenciación en productos de la amplificación del gen *rrs* del ARNr 16S en dos aislados de queso las especies de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus pentosus*.  
(28)

En condiciones normales el tiempo de tránsito gastrointestinal comprende de 2 a 4 horas y varía según el individuo. El estrés celular inicia en el estómago que posee un pH de 1,5 previo a la ingestión de alimentos; las bacterias pasan a través del estómago y entran al tracto intestinal donde son secretadas las sales biliares. <sup>(29)</sup> *L. fermentum* PBM04, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* PBM03 y *W. paramesenteroides* PBM02 fueron las cepas que exhibieron mayor tolerancia al pH ácido. Bao *et al.* (2010) reportaron en su estudio 11 cepas de *L. fermentum* con alta tolerancia a la acidez gástrica con porcentaje de supervivencia del 80% luego de 3 horas de incubación a pH 2,5. <sup>(30)</sup> En la tolerancia a sales biliares 0,3% se observó una tasa de supervivencia para las BAL, de acuerdo con estos resultados los *Lactobacillus* y *Weissella* fueron los que presentaron alta tolerancia.

La capacidad de adhesión de las bacterias con potencial probiótico es una característica importante debido a que las cepas que se pueden adherir a la mucosa intestinal podrán colonizar y ejercer un efecto benéfico al huésped y competir con microorganismos patógenos. Los aislados descritos en esta investigación, siguiendo con los criterios de selección *in vitro*, se les evaluó la capacidad para adherirse a las células epiteliales HT29, demostrando que en su totalidad las BAL tuvieron la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal. Por otro lado, en las pruebas de susceptibilidad a antibióticos los aislados resultaron sensibles a todos los antibióticos evaluados, y mostraron resistencia a Vancomicina, a excepción de los aislados de *P. acidilactici* que fueron sensibles a éste. Bernardeau *et al.* (2008) considera en su estudio, que la resistencia a antibióticos es la única causa de precaución relevante, debido a que éstas cepas tienen el potencial de servir como huéspedes de genes de resistencia a antibióticos pudiendo transferirlos a otros géneros y especies bacterianos, sin embargo, *Lactobacillus* spp en este sentido presenta una resistencia intrínseca a vancomicina no transferible. <sup>(31)</sup>

Los criterios utilizados para ser considerados probióticos en ambas investigaciones arrojan las características que deben presentar estos microorganismos para ser clasificación como probióticos. Son criterios que se determinan para evaluar *in vitro* si las BAL son de beneficio para la salud y su comportamiento cuando se enfrenta a procesos fisiológicos del organismo. La actividad bactericida, mediada por la acción de bacteriocinas es el último criterio evaluado en esta investigación, todos los aislados estudiados exhibieron actividad bactericida frente a *Salmonella entérica* y *Escherichia coli* O157-H7. Rodríguez I, (2010) a los cultivos seleccionados de *Lactobacillus* spp y *Streptococcus* spp, se les hizo producir sus bacteriocinas en sus medios líquidos correspondientes y luego se les determinó su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. Se encontró que el 29,6% representado por 8 muestras que presentaron actividad bactericida, ya que no se observa el crecimiento de estas cepas en los medios estudiados. <sup>(32)</sup> Las cepas seleccionadas por presentar tolerancia a pH ácido y sales biliares, adhesión a las células intestinal, sensibilidad a los antibióticos de importancia epidemiológica y actividad bactericida reúnen las condiciones requeridas para considerarse como potencialmente probióticas según los criterios estipulados por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).

## CONCLUSIÓN

El queso arepero artesanal que se expende en los alrededores de Valle de la Pascua, Estado Guárico no cumple con los parámetros de calidad establecidos en la normativa nacional, sólo cumple con la especificación sanitaria para *Salmonella* spp. A pesar que éstas muestras no cumplen con los indicadores de calidad, los hallazgos de este estudio, demuestran que las BAL tienen actividad inhibitoria contra patógenos como *Salmonella enterica* y *E. coli* O157:H7. Asimismo, se demostró que *L. fermentum* PBM04, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* PBM03 y *W. paramesenteroides* PBM02 cumplieron con los criterios para ser considerados probióticos, por lo que pueden resultar de interés para usos biotecnológicos como en la producción de productos lácteos fermentados (yogurt, queso, crema de leche, entre otros), uso médico-nutricional, alimentación animal, etc. Este estudio es un primer paso de caracterización para considerar estas cepas como probióticas y poderse incluir en una matriz alimentaria.

Por otra parte *P. acidilactici* PBM08 puede ser de interés biotecnológico, por su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Encuesta de Seguimiento Al Consumo de Alimentos, INE 2014.
- 2- Cremonesi P, Vanoni S, Morandi T, Silvetti B, Castiglioni N y Brasca M, Development of a pentaplex PCR assay for the simultaneous detection of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. helveticus*, *L. fermentum* in whey starter for Grana Padano cheese, Intj Food Microbiol 2011; 207-211.
- 3- Márquez J. y García C, Microflora patógena del queso blanco telita elaborado en cuatro estados de Venezuela, An Venez Nutr 2007; volumen 20 (1), 17-21.
- 4- Ramírez J, Ulloa P, Velázquez M, Ulloa J y Romero F, Bacterias lácticas: importancia en alimentos y su efecto para la salud, Rev Fuente 2011; volumen 2 (7), 12-18.
- 5- Procuraduría Federal del Consumidor (P.F.C) Calidad de los quesos, Revista del consumidor 2000; N0 278.
- 6- Potter N y Hotchkiss J, Quality control in food, FoodScience 1995; Edition 5, 90-112.
- 7- Val M, El aroma de los quesos de leche cruda marca la calidad, Digital de gastronomía mediterránea 2011.
- 8- COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales) 409. Alimentos, 1998; 3.
- 9- COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales) 3821. Queso Blanco, 2003; 2.
- 10- Parra R, Bacterias ácido lácticas papel funcional en los alimentos, Rev. Ciencias Agropecuarias 2010; Volumen 8 (1), 95-96.
- 11- Bernácer R, Probióticos y Prebióticos, Salud y bienestar 2012; 189-191.
- 12- Sanz Y, Collado M y Dalmau J, Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo, Acta Pediátrica Española 2003; volumen 61 (9), 476-482
- 13- Cagigas A y Blanco J, Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa, Cubana aliment nutr 2002; volumen 16 (1), 63-68.



- 14- Tarqui C, Álvarez D, Gómez G, Valenzuela R, Fernández I y Espinoza P, Calidad bacteriológica del agua para consumo en tres regiones del Perú, Salud Pública 2016; volumen 18 (6), 904-912.
- 15- Tabasco R, Bacterias probióticas en leche fermentada. Viabilidad, capacidad competitiva y efecto en la evolución de patologías intestinales, Tesis doctoral 2009; 13.
- 16- Mayo C, Control de la diferenciación celular in vitro en células HT-29 M6 de cáncer colorrectal, Tesis doctorales en red 2004; 18-20.
- 17- Araya M, Morelli L, Reid G, Sanders M y Stanton C, Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación, FAO 2001; 13-14.
- 18- Reséndiz M, Hernández Z, Ramírez H y Pérez A, El queso fresco artesanal de la canasta básica y su calidad sanitaria en Tuzapan, México, AICA 2012; volumen 2 (1), 253-255.
- 19- Lezcano M y Damús M, Microbiología de quesos artesanales de la ciudad de Encarnación, Itapúa, Paraguay, Estudios e Investigación del saber académico 2012; volumen 6 (1), 215–217.
- 20- Martínez V, Sandra T, Moral V, De Jesús M y García G, Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas de suero de queso de hebra fermentado, Nova Scientia 2016; volumen 8 (17), 326-339.
- 21- Jensen H, Grimmer S, Naterstad k y Axelsson L, In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria, International Journal of FoodMicrobiology 2012; volumen 153 (2), 216-222
- 22- Sangronis E y García J, Efecto de la adición de nisina en los parámetros físicos, químicos y sensoriales del queso telita, An Venez Nutr 2007; volumen 20 (1), 12-16
- 23- COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales) 1126, Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico, 1989; 1<sup>era</sup> revisión 3-5.

- 24- Valderas K, Caracterización de Cepas de Bacillus Aisladas de Muestras de Miel y de Colmena Mediante la Secuenciación del Gen Ribosomal 16S, UACH 2012; 13-16
- 25- Heiling H, Zoetendal E, Vaughan E, Philleppe M, Ankkermans A y Vos W, Molecular Diversity of *Lactobacillus* spp. and Other Lactic Acid Bacteria in the Human Intestine as Determined by Specific Amplification of 16S Ribosomal DNA, Appl Environ Microbiol 2002; volumen 68 (2), 114-123.
- 26- Toit M, Franz C, Dicks L, Schillinger U, Haberer P, Warlies B, et al, Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content, International Journal of Food Microbiology 1998; volume 40 (2), 93-104
- 27- Jacobsen C, Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans, Applied and Environmental Microbiology 1999; volumen 6 (11), 4949-4956.
- 28- Ramos B, Bautista C, Aranda E e Izquierdo F, Aislamiento, Identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical, Uciencia 2009; volumen 25 (2), 163-165
- 29- Cebeci A, Gürakan C, Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* Food, Microbiology strains 2003; volumen 20 (5), 511-518
- 30- Bao Y, Zhang Y, Zhang Y, Liu Y, Wang Y, Dong X, et al, Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products, Food Control 2010; volumen 21 (5), 695-701
- 31- Bernardeau M, Vemoux J, Henri-Dubernet S y Gueguen M, Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus, International Journal of Food Microbiology 2008; volumen 126 (3), 278-285.
- 32- Rodríguez I, Efecto de la concentración de la bacteriocina de probióticos aislados de quesos preparados artesanalmente en la región la libertada, sobre el crecimiento de bacterias patógenas, UNITRU 2010; 49-52