



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
GESTIÓN DE BIBLIOTECAS



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 1

Neiva, 17 de Marzo de 2022

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

KEYV SANDRITH ORDOÑEZ LOZANO, con C.C. No. **1.075.310.892**. Autor de la tesis y/o trabajo de grado titulado **“Bacterias ácido-lácticas (BAL) aisladas de fermentación del café, quesillo y de leche materna como agentes inhibidores de E. coli ATCC 25922”** presentado y aprobado en el año **2022** como requisito para optar al título de **Ingeniero Agrícola**.

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

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

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

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: Sandrith Ordoñez

Vigilada Mineducación

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

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

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO:

"BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (BAL) AISLADAS DE FERMENTACIÓN DEL CAFÉ, QUESILLO Y DE LECHE MATERNA COMO AGENTES INHIBIDORES DE E. COLI ATCC 25922"

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
ORDÓÑEZ LOZANO	KEYV SANDRITH

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
AMOROCHO CRUZ	CLAUDIA MILENA

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: INGENIERA AGRÍCOLA

FACULTAD: INGENIERÍA

PROGRAMA O POSGRADO: INGENIERÍA AGRÍCOLA

CIUDAD: NEIVA-HUILA

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2022 NÚMERO DE PÁGINAS: 31 PÁGS.

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas___ Fotografías X Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general X Grabados___
 Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___ Tablas
 o Cuadros X

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

Vigilada Mineducación

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

MATERIAL ANEXO:

Se adjunta la carta de solicitud a trabajo de grado con mención: MERITORIA

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

MERITORIA

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. BAL	LAB	6. Probiótico	Probiotic
2. Acción Antimicrobiana	Antimicrobial Action	7. _____	_____
3. Patógeno	Pathogen	8. _____	_____
4. Alimento Funcional	Functional Food	9. _____	_____
5. Enfermedades de transmisión alimentaria	Food-borne diseases	10. _____	_____

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

En la búsqueda de generar nuevas alternativas que sean naturales y menos dañinas para el cuerpo, se ha optado en el uso de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) por su capacidad de crecer en diferentes condiciones y generar antagonismo frente a otros microorganismos. El presente estudio buscó determinar diferentes parámetros que son necesarios para catalogar a una BAL como probiótico, por lo que se evaluó la cinética de crecimiento de cepas nativas aisladas de diferentes productos de la región Huila-Colombia, el poder antimicrobiano frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a través de la difusión de discos y pocillos, la susceptibilidad a los antibióticos Ciprofloxacina, Penicilina y Ceftriaxona con la técnica de Kirby-Bauer y la capacidad de resistir a condiciones gastrointestinales (pH 2,0 y pH 8,0). Se obtuvo un crecimiento de $9,8 \times 10^8$, $2,2 \times 10^9$, $2,3 \times 10^9$ y $1,4 \times 10^8$ UFC/ml para las cepas JC, L, D Y 12 respectivamente. Las cepas que destacaron en la inhibición frente al patógeno, fueron las obtenidas de la fermentación del café (L y D). Se evidenció sensibilidad de las BAL ante los antibióticos evaluados. En condiciones gastrointestinales se observó la disminución de su viabilidad a pH 2,0 mientras que en pH 8,0 mantienen su población, por lo que se sugiere el uso de estas BAL en mayores cantidades para soportar el paso por el tracto intestinal y puedan ejercer su acción probiótica. Los resultados obtenidos demuestran la efectividad de las cepas (L y D), en caso de querer utilizarse como probiótico podrían emplearse como tratamiento bioterapéutico y contrarrestar enfermedades de transmisión alimentaria provocadas por *E. coli* ATCC 25922, evidenciando la necesidad de realizar estudios in vivo.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

Vigilada Mineducación

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

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

In the search to generate new alternatives that are natural and less harmful to the body, Lactic Acid Bacteria (LAB) have been chosen for their ability to grow in different conditions and generate antagonism against other microorganisms. The present study sought to determine different parameters that are necessary to classify a LAB as probiotic, therefore, the growth kinetics of native strains isolated from different products of the Huila-Colombia region were evaluated, the antimicrobial power against *Escherichia coli* ATCC 25922 through the disc and well diffusion, susceptibility to the antibiotics Ciprofloxacin, Penicillin and Ceftriaxone with the Kirby-Bauer technique and the ability to resist gastrointestinal conditions (pH 2.0 and pH 8.0). Growth of 9.8×10^8 , 2.2×10^9 , 2.3×10^9 , and 1.4×10^8 CFU/ml was obtained for strains JC, L, D, and 12, respectively. The strains that stood out in the inhibition against the pathogen were those obtained from coffee fermentation (L and D). The sensitivity of LAB to the antibiotics tested was evidenced. In gastrointestinal conditions, a decrease in their viability was observed at pH 2.0, while at pH 8.0 they maintained their population, therefore, the use of these LAB in larger quantities is suggested to support the passage through the tract and to allow them to exert their probiotic action. The results obtained demonstrate the effectiveness of the strains (L and D), in case of wanting to use them as probiotics, they could be used as biotherapeutic treatment and counteract food-borne diseases caused by *E. coli* ATCC 25922, showing the need for in vivo studies.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Jurado: PhD. (c) Erika Tatiana Cortés Macías

Firma: Erika Tatiana Cortés Macías

Nombre Jurado: PhD. Carolina Acosta Romero

Firma: Carolina Acosta Romero

Vigilada Mineducación

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

BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (BAL) AISLADAS DE FERMENTACIÓN DEL CAFÉ, QUESILLO Y DE LECHE MATERNA COMO AGENTES INHIBIDORES DE *E. COLI* ATCC 25922

Ordoñez- Lozano, Sandrith ¹, Amorocho-Cruz, C. M ²

RESUMEN

En la búsqueda de generar nuevas alternativas que sean naturales y menos dañinas para el cuerpo, se ha optado en el uso de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) por su capacidad de crecer en diferentes condiciones y generar antagonismo frente a otros microorganismos. El presente estudio buscó determinar diferentes parámetros que son necesarios para catalogar a una BAL como probiótico, por lo que se evaluó la cinética de crecimiento de cepas nativas aisladas de diferentes productos de la región Huila-Colombia, el poder antimicrobiano frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a través de la difusión de discos y pocillos, la susceptibilidad a los antibióticos Ciprofloxacina, Penicilina y Ceftriaxona con la técnica de Kirby-Bauer y la capacidad de resistir a condiciones gastrointestinales (pH 2,0 y pH 8,0). Se obtuvo un crecimiento de $9,8 \times 10^8$, $2,2 \times 10^9$, $2,3 \times 10^9$ y $1,4 \times 10^8$ UFC/ml para las cepas JC, L, D Y 12 respectivamente. Las cepas que destacaron en la inhibición frente al patógeno, fueron las obtenidas de la fermentación del café (L y D). Se evidenció sensibilidad de las BAL ante los antibióticos evaluados. En condiciones gastrointestinales se observó la disminución de su viabilidad a pH 2,0 mientras que en pH 8,0 mantienen su población, por lo que se sugiere el uso de estas BAL en mayores cantidades para soportar el paso por el tracto intestinal y puedan ejercer su acción probiótica. Los resultados obtenidos demuestran la efectividad de las cepas (L y D), en caso de querer utilizarse como probiótico podrían emplearse como tratamiento bioterapéutico y contrarrestar enfermedades de transmisión alimentaria provocadas por *E. coli* ATCC 25922, evidenciando la necesidad de realizar estudios *in vivo*.

Palabras clave: BAL, Acción antimicrobiana, Patógeno, Alimento Funcional, Probiótico, Enfermedades de Transmisión Alimentaria.

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

ABSTRACT

In the search to generate new alternatives that are natural and less harmful to the body, Lactic Acid Bacteria (LAB) have been chosen for their ability to grow in different conditions and generate antagonism against other microorganisms. The present study sought to determine different parameters that are necessary to classify a LAB as probiotic, therefore, the growth kinetics of native strains isolated from different products of the Huila-Colombia region were evaluated, the antimicrobial power against *Escherichia coli* ATCC 25922 through the disc and well diffusion, susceptibility to the antibiotics Ciprofloxacin, Penicillin and Ceftriaxone with the Kirby-Bauer technique and the ability to resist gastrointestinal conditions (pH 2.0 and pH 8.0). Growth of 9.8×10^8 , 2.2×10^9 , 2.3×10^9 , and 1.4×10^8 CFU/ml was obtained for strains JC, L, D, and 12, respectively. The strains that stood out in the inhibition against the pathogen were those obtained from coffee fermentation (L and D). The sensitivity of LAB to the antibiotics tested was evidenced. In gastrointestinal conditions, a decrease in their viability was observed at pH 2.0, while at pH 8.0 they maintained their population, therefore, the use of these LAB in larger quantities is suggested to support the passage through the tract and to allow them to exert their probiotic action. The results obtained demonstrate the effectiveness of the strains (L and D), in case of wanting to use them as probiotics, they could be used as biotherapeutic treatment and counteract food-borne diseases caused by *E. coli* ATCC 25922, showing the need for *in vivo* studies.

Keywords: LAB, Antimicrobial action, Pathogen, Functional food, Probiotic, Food-borne diseases.

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la población se ha visto afectada por un grave problema de salud pública por las Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA) (Soto, *et al.*, 2016), la salud del consumidor se pone en riesgo al ingerir alimentos y/o bebidas contaminadas de microorganismos patógenos debido a un mal manejo, produciendo en el consumidor distintos síntomas gastrointestinales, consecuencia que también trae el bajo contenido de microbiota intestinal, que genera bajas defensas en el sistema inmunológico, facilitando a microorganismos patógenos la colonización del tracto gastrointestinal y haciéndolo susceptible ante enfermedades producidas por toxinas generadas por agentes patógenos (Zamudio, *et al.*, 2017) como lo son diarreas y vómitos entre lo más leves; pero también otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, hasta complicaciones que pueden conducir a la muerte (Gonzales y Rojas, 2005).

Escherichia coli es uno de los microorganismos más conocidos y mejor estudiados dentro de las enterobacterias (Gram Negativas), tiene una amplia distribución en el suelo, agua y, aunque es un residente inocuo del tracto gastrointestinal varios estudios han documentado que, cepas de *E. coli* se han visto implicadas en diarreas, enfermedades extraintestinales y patologías infecciosas tan habituales como prostatitis, infección hepatobiliar, abscesos, entre otros, causando morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Sauca, *et al.*, 1997; Croxen, *et al.*, 2013).

Los antibióticos usualmente son usados para combatir infecciones ocasionadas por bacterias, estos son moléculas formadas ocasionalmente por sustancias generadas durante el metabolismo de bacterias y hongos principalmente, como también pueden ser elaborados por compuestos obtenidos por síntesis química capaz de inhibir o eliminar el crecimiento de una bacteria patógena. (De la Fuente-Salcido, *et al.*, 2015).

Pero a través de los años se ha podido evidenciar que las bacterias patógenas han desarrollado varios mecanismos de resistencia a los antibióticos como: modificación enzimática del antibiótico, bombas de expulsión, cambios en la permeabilidad de la membrana externa y alteraciones del sitio de acción, que dificultan el manejo terapéutico de las enfermedades producidas por estos microorganismos (Tafur, *et al.*, 2008). En efecto, *E. coli* ha adquirido una gran resistencia antibiótica, lo cual es un fenómeno biológico natural debido a las mutaciones y a la gran capacidad de las bacterias de transferir horizontalmente su material genético, esto ha sido un problema emergente a nivel mundial (Mosquito, *et al.*, 2011) por eso es importante conocer el tipo específico de *E. coli* que se está trabajando, para así mismo tratarlo.

Debido a las resistencias que ha generado esta bacteria se han buscado otras alternativas de tratamiento y control. Desde hace algún tiempo se utilizan las BAL, como conservantes de alimentos, porque producen sustancias antimicrobianas como el ácido láctico, el etanol y péptidos denominados bacteriocinas, entre otras, las cuales inhiben el desarrollo de un gran número de bacterias patógenas. (Agudelo, *et al.*, 2016). Es de esta manera que se recurre a

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

probióticos que aportan inmunidad al sistema gastro digestivo con su crecimiento. Los probióticos son microorganismos gram positivos, microaerófilos, fermentadores de carbohidratos, que producen especialmente ácido láctico, razón por la cual se les considera “bacterias ácido lácticas” (BAL) siendo los lactobacilos y bifidobacterias los de mayor importancia en la actualidad; estos microorganismos son bioterapéuticos por los beneficios en la salud humana tales como: facilitar la digestión de la lactosa, proteger contra enfermedades gastrointestinales, del trato urogenital y respiratorio, equilibrar el sistema inmunológico, prevenir y tratar enfermedades dermatológicas y proteger contra el cáncer de colon. Una de las características más importantes para un probiótico es la resistencia a las condiciones de sistema gastrointestinal, de modo que pueda adherirse al epitelio intestinal y colonizarlo para un crecimiento óptimo. (Salazar y Montoya, 2003; Zamudio, *et al.*, 2017).

Las BAL tienen la capacidad de conservar a los productos lácteos debido a diferentes metabolitos ácidos, entre los cuales se encuentran los ácidos orgánicos como: el ácido láctico y las bacteriocinas, además se les atribuye la prevención del crecimiento de microorganismos patógenos, estables a diferentes pH y temperaturas. Lo anterior, muestra que son compuestos con potencial interesante para la industria alimentaria, incrementando la producción de alimentos funcionales, entre ellos los probióticos (Adaptado de Heredia, *et al.*, 2017; Fahrurrozi *et al.*, 2019).

Dada las situaciones que viven muchas poblaciones por el consumo de aguas contaminadas y alimentos con mal manejo, se buscan alternativas diferentes a la de los antibióticos, puesto que las bacterias han generado resistencia y una adaptabilidad a este tipo de medicamentos, por lo que en esta investigación se recurre a experimentar y evaluar BAL de productos colombianos y su comportamiento antimicrobiano frente a la *E. coli* ATCC 25922.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el comportamiento del patógeno *Escherichia Coli* ATCC 25922 frente a diferentes BAL aisladas de leche materna, quesillo y fermentación de café como alternativa para contrarrestar su acción.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Conocer la cinética de crecimiento de cada una de las cepas BAL.

Analizar la acción en presencia y ausencia de BAL obtenidas del proceso de fermentación del café, quesillo y de leche materna, para contrarrestar *E. coli* ATCC 25922.

Evaluar la viabilidad de las cepas BAL a pH 2,0 y 8,0, simulando las condiciones gastrointestinales.

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas BAL

Se activaron las cepas BAL (JC, L, D, 12) (Figura 1) almacenadas a -20°C de la colección del laboratorio de Microbiología de alimentos (Facultad de Ingeniería, Universidad Surcolombiana) de investigaciones previas.

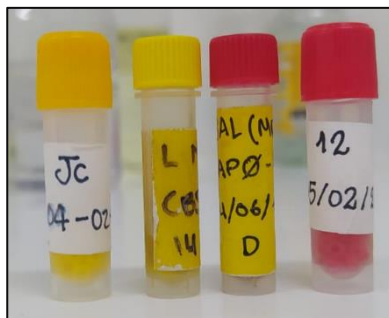


Figura 1. BAL (JC, L, D, 12) almacenadas en crioviales. Fuente: Autores.

Las BAL L y D provienen del proyecto de investigación (Ladino, 2017); la BAL 12 procede del trabajo realizado por (Cortés, *et al.*, 2014), y la BAL JC es proveniente de leche materna. De cada una se tomó una porción y se realizó una siembra en superficie en medio de agar Man, rogosa y Sharpe (MRS, Conda, España), seguidamente se llevaron a incubar (Heratherm, IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 h, después, realizando siembra en triple estría con un asa de platino en medio MRS se aislaron las colonias para una resiembra en superficie con MRS y nuevamente se incubaron (Heratherm, IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) por 24 h.

3.2. Cinética de crecimiento de BAL

Para la cinética de crecimiento de BAL (Figura 2), se realizó la inoculación de cada una de las BAL (JC, 12, L y D) en caldo MRS, llevándose a incubar a 37°C. Se tomaron dos muestras en diferentes tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 26, 30, 32 y 48 horas, una muestra para observar la absorbancia que fue medida en el espectrofotómetro a 600 nm (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 UV/ VIS, Reino Unido), teniendo en cuenta el blanco, que fue el caldo de Man, rogosa y Sharpe (MRS Broth, Oxoid, Inglaterra) sin inóculo, esto para ajustarlo a 0 nm. Con la otra muestra se realizaron diluciones seriadas y fueron sembradas en placas de agar MRS, se incubaron a 37°C por 24 horas. En todos los casos la siembra fue por duplicado. En cada medición se determinó conteo de microorganismos viables en placa (UFC/ml).

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

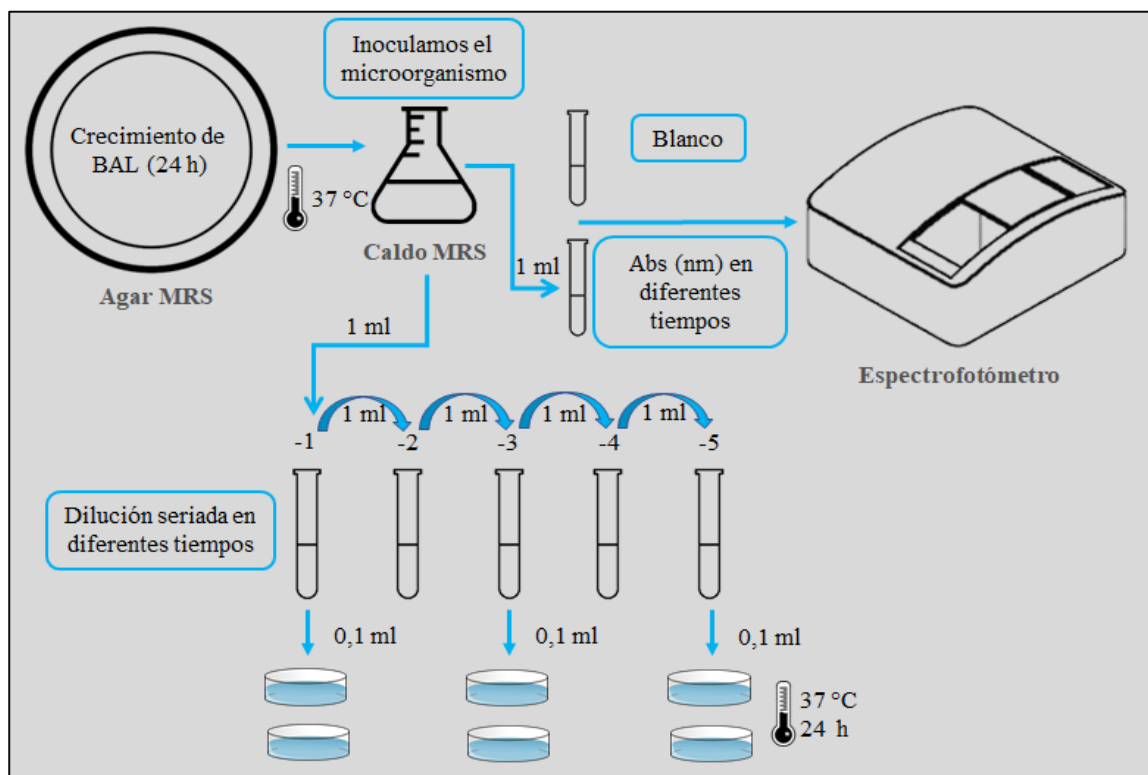


Figura 2. Esquema del ensayo de cinética de crecimiento de las BAL (JC, L, D, 12). Fuente: Autores.

3.3. Actividad antimicrobiana

3.3.1. Cepa bacteriana *Escherichia coli* ATTC 25922

El patógeno de la cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922 (KWIK STIK), se activó extrayendo el líquido hidratante de la cepa, realizando una siembra en triple estría con un asa de platino en medio P.C.A (Plate Count Agar, Conda, España), para el aislamiento de un cultivo puro; la placa se incubó (Heratherm, IMH 60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 h.

Orden de crecimiento del patógeno

La siembra se realizó en el medio P.C.A (Plate Count, Conda, España), se incubó (Heratherm, IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a temperatura de 37°C durante 24 h, se tomó una porción de crecimiento en placa y se depositó en 9 ml de agua de peptona (Merck, Alemania) con ayuda del vortex se agitó hasta una escala de Mc. Farland 0.5%, seguido, se realizaron diluciones seriadas con volúmenes de 1000 µl, en placas se sembró en superficie con asa de platino un volumen de 100 µl. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h. En todos los casos la siembra se realizó por duplicado. Mediante tinción gram se identificó fenotípicamente.

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

Recuento unidades de crecimiento microbiano

El recuento de las colonias en placa para las diluciones empleadas fue registrado y mediante la siguiente ecuación **(1)** se determinó el orden de crecimiento del patógeno.

$$UFC * ml^{-1} = \frac{NC}{Vol * ND} \quad (1)$$

Donde, **NC:** número de colonias de crecimiento en placa. **Vol.:** volumen de siembra (0.1 ml) y **ND:** dilución de conteo de colonias.

3.3.2. Activación cepas BAL aisladas

Se realizó la reactivación de cada una de las cepas en agar MRS, posteriormente fueron incubadas a 37° C durante 24 h.

3.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de BAL frente a patógeno *Escherichia coli* ATCC 25922

Se evaluó el impacto de las BAL en presencia y ausencia de células frente al patógeno *Escherichia coli*. Para ambas metodologías se considera inhibición cuando la medida del halo es mayor a 2 mm (Estrada, *et al.*, 2005).

3.4.1. Método de discos

La actividad de las BAL en presencia de células fue determinada mediante la técnica de difusión de discos (Figura 3). El cultivo bacteriano patógeno se inoculó y fue ajustado a 0.5 escala McFarland en medio de agar para método estándar - P.C.A (Plate Count Agar, Conda, España). Por otro lado, en las placas de agar MRS con crecimiento de cada cepa láctica se cortaron discos de 7 mm de diámetro (JC, L, D, 12) usando un sacabocados estéril (Amorocho-Cruz CM, 2011) y un pocillo para el control positivo, que fueron 50 µl del antibiótico Ciprofloxacino (Bioquímico Pharma S.A, Colombia). Las placas se incubaron (Heratherm, IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 h. La franja de inhibición por las BAL fue medida con una regla (mm).

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

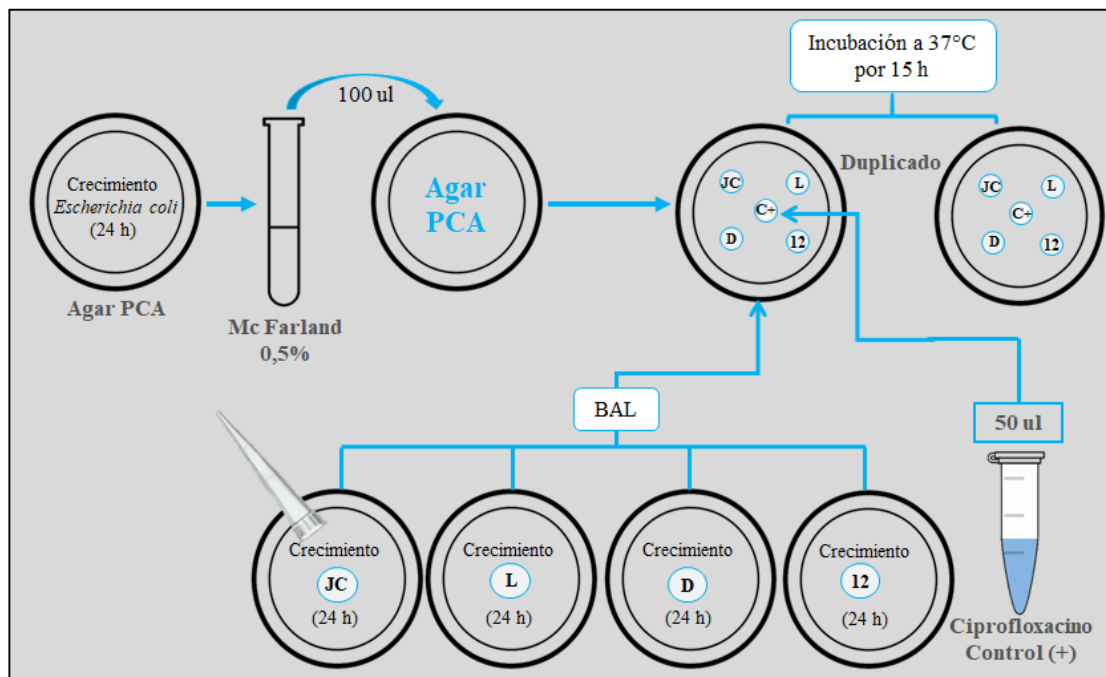


Figura 3. Esquema del ensayo de actividad antimicrobiana en presencia de células de las BAL frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Fuente: Autores.

3.4.2. Método de pocillos

Mediante la técnica de difusión de pocillos, se apreció el comportamiento de las BAL frente al patógeno en ausencia de células (Figura 4).

Para el filtrado de células de las BAL, en cada caso se extrajo una porción de ellas (MRS), se depositaron en tubos que contenían caldo MRS y se incubaron (Heratherm, IMH 60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37° C, pasadas las 24h en eppendorf, fue adicionado el líquido (BAL) para ser llevado a centrifuga (Heraus- pico 17, Thermo Scientific, Alemania) a 6000 rpm durante 10 minutos, finalmente con ayuda de filtros de membrana de acetato de celulosa (CA) con porosidad de 0,2 µm (Sartorius stedim - Minisart , Alemania) se separó el sobrenadante para dejar la sustancia libre de células.

El cultivo bacteriano patógeno se inoculó en medio de agar - P.C.A y fue ajustado a 0.5 escala McFarland, se seccionaron cinco pocillos de 7 mm de diámetro en la placa del medio de cultivo inoculado usando un sacabocados estéril (Amorocho-Cruz CM, 2011), se adicionaron 50 µl en cada pocillo de cada sobrenadante y como control positivo fue el antibiótico Ciprofloxacino (Bioquímico Pharma S.A, Colombia). Las placas se incubaron (Heratherm, IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24h. El halo de inhibición generado por las BAL fue medido con una regla (mm).

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

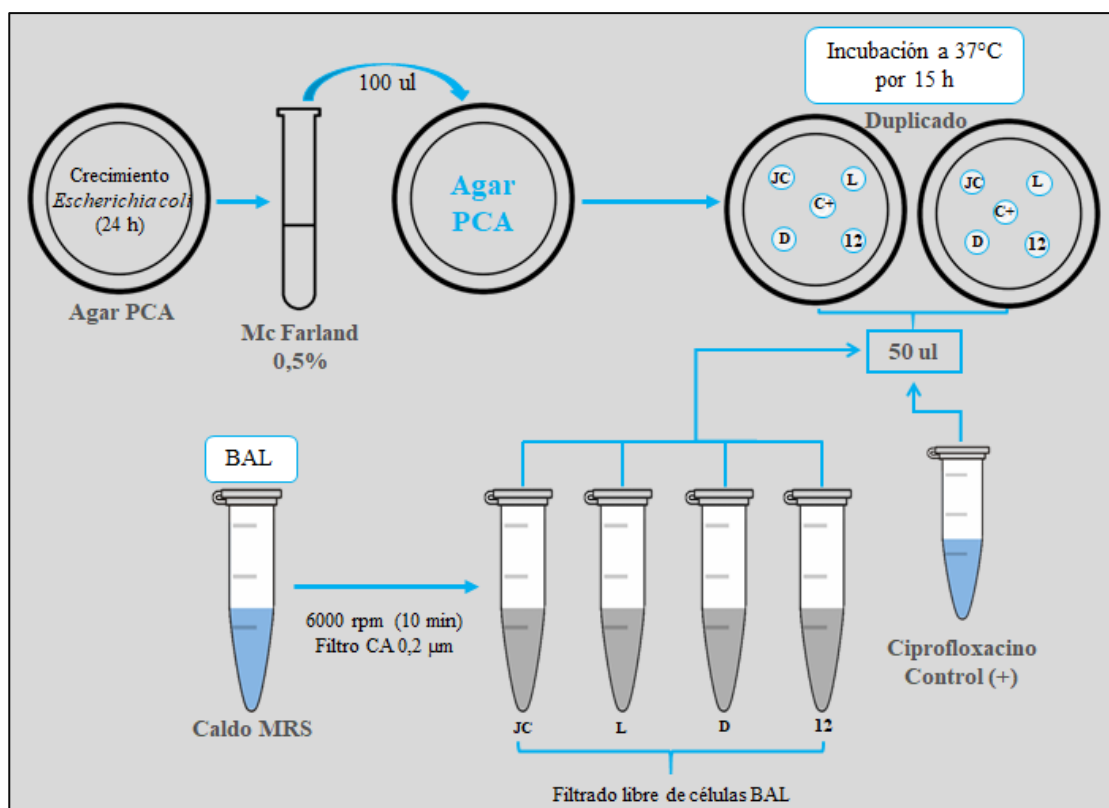


Figura 4. Esquema del ensayo de actividad antimicrobiana en ausencia de células de BAL frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Fuente: Autores.

3.5. Antibiógramas

Se evaluaron las cepas BAL mediante la técnica de difusión de pocillos (Bauer, *et al.*, 1966) con los antibióticos Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200.000 U.I.), Ceftriaxona (Nirlife-Aculife, India) y Ciprofloxacina (Bioquímico pharma S.A, Colombia) en medio de agar MRS, donde fueron sembradas en masa las cepas lácticas, seguidamente se cortaron 3 pocillos de 7 mm de diámetro en la placa del medio de cultivo inoculado usando un sacabocados estéril (Amorocho-Cruz CM, 2011). En cada pocillo se adicionaron 50 µl del respectivo antibiótico, en todos los casos se realizó por duplicado. Finalmente se incubaron (Heratherm, IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 h. La zona de inhibición generada por los antibióticos fue medida con una regla (mm).

3.6. Determinación de la viabilidad y estabilidad de BAL a pH ácido y básico “*in vitro*”

Las 4 BAL (JC, 12, L y D), se inocularon en caldo MRS e incubaron a 37°C durante 24 h. Se tomó 1 ml del cultivo en caldo MRS y se centrifugó a 7.000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS 1X (Anexo 1) tres veces con el fin de eliminar los restos de caldo MRS. Se re-suspende en 1000 µl del tampón PBS 1X y se ajusta a una

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

concentración celular de escala 2% de McFarland, este medio fue previamente ajustado a pH 2,0 y 8,0 (ácido y básico) usando HCl 0,1% y NaOH 0,1%.

Teniendo en cuenta el proceso digestivo del ser humano, el tránsito intestinal tiene una duración de entre 3 y 6 horas, por lo cual se evaluaron las BAL para pH 2,0 a tiempos de 0, 5, 40 y 180 minutos y para pH 8,0 a 0, 240 y 360 minutos (Figura 5). Además, se consideró el control que corresponde a la inoculación de cada BAL en caldo MRS al pH generado por cada cepa en estudio en los tiempos 0, 180 para condiciones ácidas, y 0 y 360 para condiciones alcalinas.

En cada uno de estos tiempos se tomó 1 ml del medio para hacer dilución seriada hasta -9. Seguido a esto se sembraron alícuotas de 0,1 ml en cada placa con agar MRS, se llevaron a incubar a 37°C durante 24 y 48 horas. Cada ensayo se realizó por duplicado, como lo indica (Amorocho-Cruz CM, 2011).

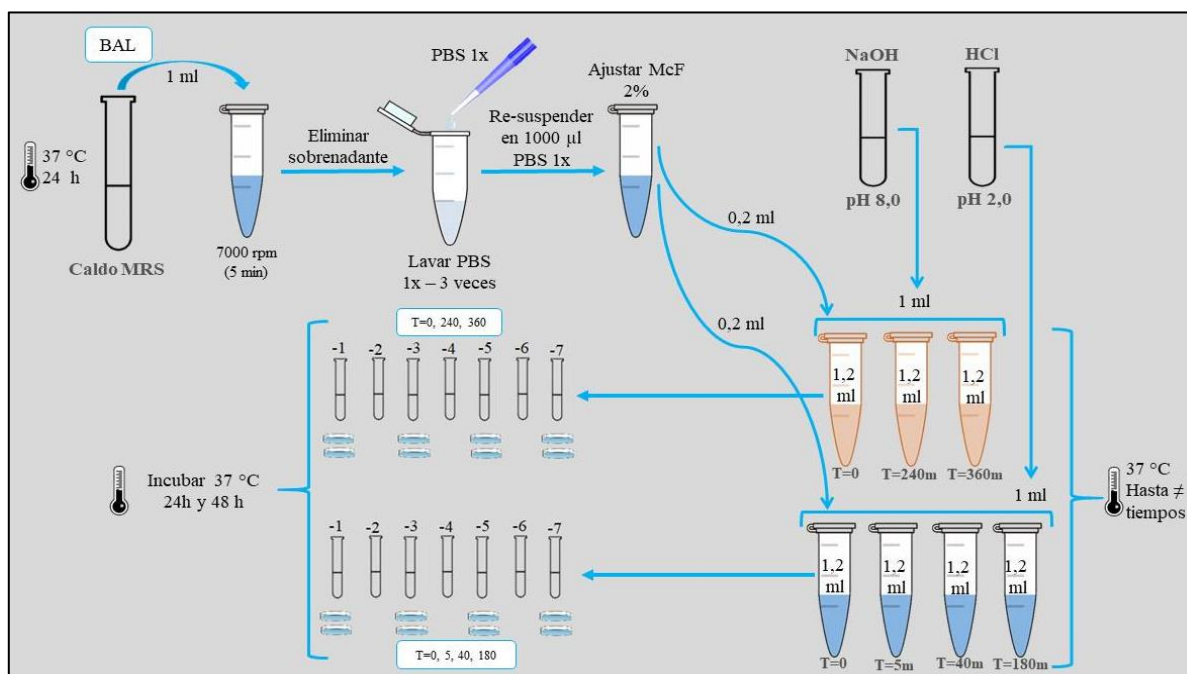


Figura 5. Esquema del ensayo de viabilidad y estabilidad de BAL a condiciones gastrointestinales simuladas a pH ácido y básico. Fuente: Autores.

3.7. Análisis de estadístico

En el análisis estadístico se hizo uso del programa informático StatGraphics (Centurión XVI Versión 16.1.03). Se realizó un análisis de varianza ANOVA multifactorial con un nivel del 95,0% de confianza, para los resultados de actividad antimicrobiana de BAL en presencia y ausencia de células obtenidos en laboratorio, determinando así, como los factores implicados (BAL y Métodos de difusión: discos y pocillos) afectaban significativamente sobre el porcentaje de inhibición, permitiendo una comparación entre

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

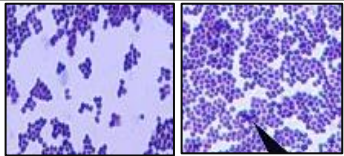
ellos, finalmente con los datos recolectados en el ensayo de las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) con un nivel del 95,0% de confianza para observar si existían diferencias significativas entre los diferentes tiempos de exposición a pH ácido y alcalino.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Cepas BAL

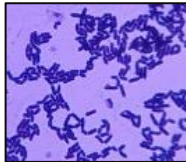
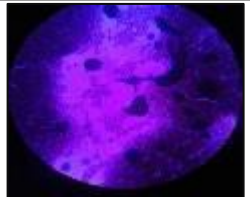
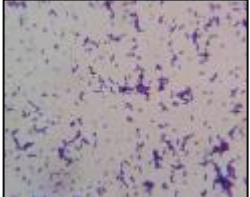
La identificación morfológica de las cepas nativas JC, L, D y 12 fueron determinadas por sus características macroscópicas, tales como la observación en placa de las colonias y microscópicas a través de tinción Gram, propuesta por Cristian Gram en 1884, con el fin de observar si estos microorganismos en estudio correspondían a bacterias Gram positivas (López-Jácome, *et al.*, 2014), característica de las BAL. La tabla 1, muestra la descripción correspondiente a cada una de las BAL, y evidencia que son microorganismos que constituyen el grupo de bacterias gram-positivas.

Tabla 1. Caracterización morfológica en placa (Medio – Agar MRS) y tinción gram de BAL.

CEPA	CARACTERIZACIÓN	DESCRIPCIÓN	COLONIA Y TINCIÓN GRAM
JC	Macroscópica	Colonias redondeadas, con bordes lisos, blanca lechosa, opaca, cóncavas, aspecto húmedo-brillante, tamaño aproximado a 1 mm.	
	Microscópica	Cocos uniformes, en forma de racimos, con diámetros que oscilan entre 0,9 y 1 µm, gram positivas.	
L	Macroscópica	Colonias circulares, con bordes lisos redondeados, de color blanco cremoso, translucidas, superficie cóncava, aspecto húmedo-brillante, con tamaño aproximado a 1,8 mm.	

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

	Microscópica	Bacilos alargados con extremos lisos redondeados, en forma empalizada, con medidas aproximadas a 2,5 μm de largo y 0,86 μm de ancho, gram positivas.	
D	Macroscópica	Colonias de color blanca lechosa, con diámetro 4 mm de forma circular definida. (Tomado de cortés, 2019).	
	Microscópica	Se observaron bacilos cortos con extremos lisos – sin agrupación, identificando la bacteria como Gram positiva (Ladino, 2017).	
12	Macroscópica	Esta cepa tiene colonias de forma redondeada de color blanco en la periferia, en el centro color lechoso, con diámetro de 3 mm.	
	Microscópica	Se observaron bacilos, identificando la bacteria como Gram positiva (Cortés, 2015).	

Estas características morfológicas son similares a las reportadas por Ramírez-López *et al.*, (2016) a cepas de *Lactobacillus*; lo cual es confirmado en un estudio previo realizado por Cortés-Gaona *et al.*, (2021), donde la característica fenotípica de una de estas cepas es *Lactobacillus acidophilus* 3, Jackson *et al.*, (2002) en sus estudios menciona que la morfología de la colonia no es un predictor preciso de la identidad del género, por lo que para estudios posteriores es recomendable realizar pruebas específicas de biología molecular.

4.2. Cinética de crecimiento

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar en la figura 6 el crecimiento de cada una de las cepas de BAL, tres de ellas (L, D y 12) presentan un crecimiento de moderadamente rápido en comparación a JC.

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

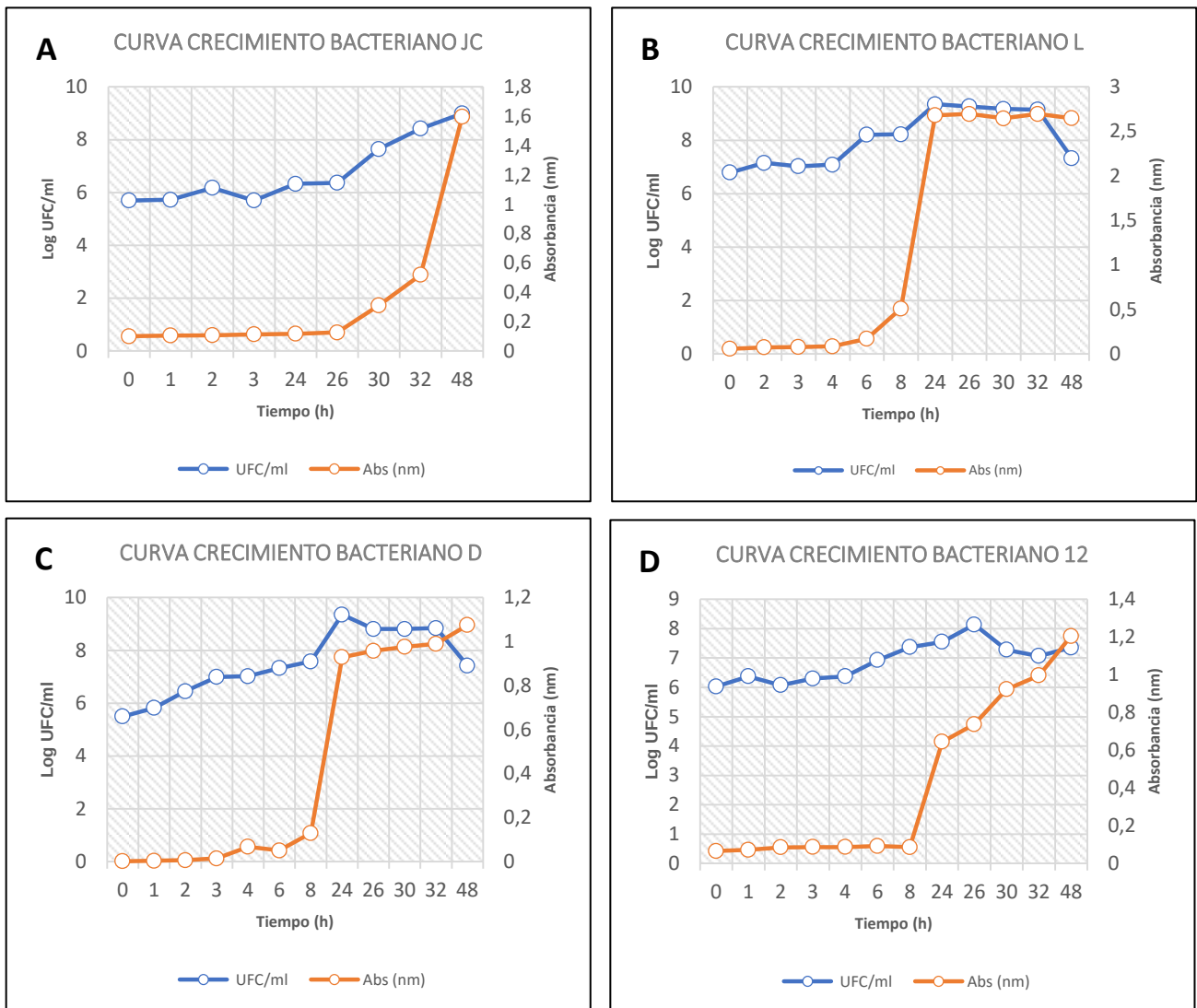


Figura 6. Curvas de crecimiento y absorbancia de las BAL. (A) JC, (B) L, (C) D y (D) 12. Fuente: Autor.

Las curvas describen perfectamente cada una de las fases, mostrando que unas cepas se tomaron más tiempo en adaptar su metabolismo a las nuevas condiciones (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) (Agudelo, *et al.*, 2010) como se puede apreciar en la cepa JC (Figura 6A), que presenta la fase de latencia hasta la hora 26 e inicia su fase exponencial de una manera acelerada desde la hora 30. La cepa L y D (Figura 6B y 6C) obtenidas de la fermentación del café, tienen una similitud en su comportamiento, su fase de latencia va desde el tiempo 0 hasta las 4 horas, mostrando su fase exponencial hasta las 24 horas que alcanza su máxima población, en este tiempo llega a su fase estacionaria hasta las 48 horas que se tomaron las lecturas, se puede observar un pequeño declive estadísticamente significativo con un 95,0% de nivel de confianza en las curvas del recuento UFC/ml desde la hora 32 a 48, comportamiento que no muestra la curva de absorbancia debido a que en las mediciones por espectrofotometría en la fase de muerte los

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

microorganismos generan mayor turbidez por ruptura de las células del mismo (Escobar, *et al.*, 2010). La cepa 12 (Figura 6D) presenta su fase de latencia hasta el tiempo de 6 horas, donde inicia su fase exponencial hasta las 30 horas de fermentación, en la cual las BAL, consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio, de allí llega a su fase final que va hasta las 48 horas que fueron tomadas las lecturas.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de crecimiento de BAL.

CEPA	TIEMPO (h)	C _{máx} (UFC/ml)	Abs (nm)	Td (h)
JC	48	$9,8 \times 10^8 \pm 0,03$	1,57	3,6
L	24	$2,2 \times 10^9 \pm 0,21$	2,68	1,8
D	24	$2,3 \times 10^9 \pm 0,07$	1,10	1,5
12	26	$1,4 \times 10^8 \pm 0,14$	0,65	3,7

C_{máx} fue expresada en media $\pm$ desviación estándar. Abs: La absorbancia expresada en nm. Td: Tiempos promedio de duplicación.

De esta manera se considera que las cepas L y D alcanzan la fase exponencial más rápido que las demás cepas, llegando a su máximo crecimiento a las 24 horas, con valores (Tabla 2) de $2,2 \times 10^9$ UFC/ml (Absorbancia 2,7) y $2,3 \times 10^9$ UFC/ml (Absorbancia 1,1) respectivamente, estas cepas muestran un crecimiento similar al realizado en ensayos anteriores por Narváez, *et al.*, (2017) y Gómez, E., (2013) con valores de crecimiento máximo de orden 10^9 UFC/ml y de este último con tiempos promedio de duplicación (Td) de 1,49 h, a lo que se le puede atribuir una semejanza, ya que nuestras cepas obtuvieron tiempos de duplicación 1,8 h y 1,5 h, de igual manera concuerdan con los resultados obtenidos por Escobar, *et al.*, 2010 en su estudio con la cepa *Lactobacillus casei* con crecimiento de orden de 10^9 y 10^{10} UFC/ml en medio de suero de leche, los resultados obtenidos en este ensayo son superiores al crecimiento máximo obtenido por Jurado-Gómez *et al.*, (2014) en *L. casei* con valor de $7,3 \times 10^8$ UFC/ml en medio MRS. La cepa 12, muestra un crecimiento similar al estudio realizado por Ramírez-López *et al.*, (2016) en sus aislados de queso fresco artesanal con un crecimiento de $9,4 \times 10^8$ UFC/ml de la cepa *Lactobacillus plantarum*.

A diferencia de las cepas mencionadas anteriormente, JC tarda más tiempo en alcanzar esta fase, debido tal vez a su origen, ya que procede de leche humana, obtenida al año y medio de lactancia. Es posible que la incubación en anaerobiosis mejore el crecimiento de cada una de estas cepas.

Las cepas en estudio han alcanzado una concentración entre 10^8 y 10^9 UFC/ml, lo cual es considerado como un óptimo crecimiento (Kaban & Kaya, 2006) y pueden estar siendo consideradas en la preparación de inóculos con propiedades probióticas.

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

4.3. Actividad antimicrobiana

4.3.1. Cepa Bacteriana

Las características morfológicas de la cepa bacteriana *Escherichia Coli* ATCC 25922 fueron observadas a partir de la suspensión (escala McFarland 0,5%), donde se obtuvieron colonias aisladas circulares filamentosas, con bordes irregulares (Lobulado - espiculado) y con la apariencia de seguir expandiéndose, sin elevación - plana, color blanco lechoso, densidad opaca, de superficie brillante, con un diámetro que oscila entre los 1,5 y 3 mm (Figura 7). A través del microscopio se observaron bacilos rectos, con bordes lisos redondeados, con un largo de 4,2 μm y un ancho de 1,6 μm aproximadamente, gram negativas (Figura 8).

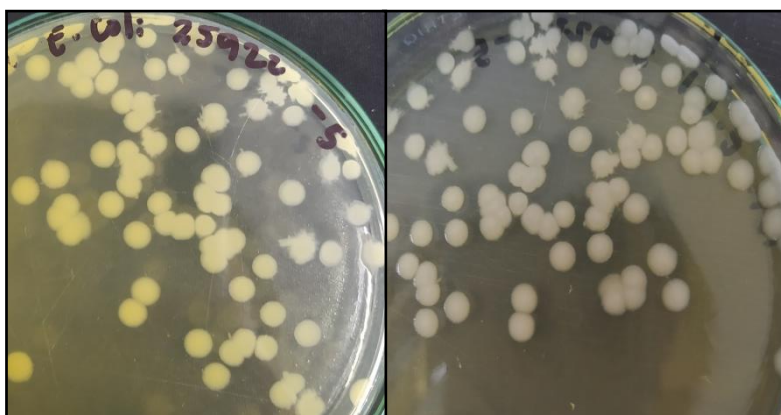


Figura 7. Características macroscópicas de *Escherichia Coli* ATCC 25922 en agar PCA.

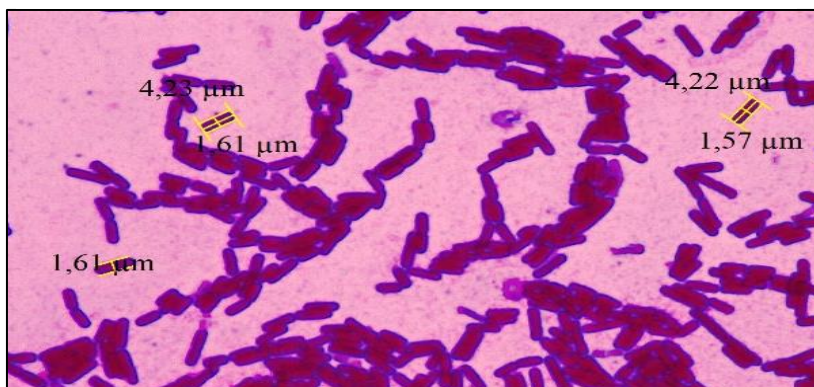


Figura 8. Características microscópicas de *Escherichia Coli* ATCC 25922 (Objetivo 100x/1.25 OIL).

La actividad antimicrobiana realizada a cada una de las BAL en presencia y ausencia de células, tuvo una concentración de $6,60 \pm 0,43 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/ml}$ de la cepa bacteriana *Escherichia Coli* ATCC 25922 (Tabla 3).

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

Tabla 3. Orden de crecimiento de la cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC 25922

Patógeno	Tratamientos actividad antimicrobiana	Log UFC·ml ⁻¹
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	BAL en presencia y ausencia de células (pH ácido)	6,60 ± 0,43

Log UFC ml⁻¹ fue expresada en media ± desviación estándar.

4.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de BAL frente al patógeno *Escherichia coli* ATCC 25922

Se emplearon dos métodos: En presencia de células de las BAL y en ausencia de células de las BAL.

4.4.1. Método de discos

En el método de presencia de células de las BAL, método cualitativo (disco difusión) nos permite clasificar directamente al microorganismo como sensible o resistente (Taroco, *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en la evaluación de las BAL en presencia de células se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Zona de inhibición de las BAL con el método de difusión de discos.

BAL	JC	L	D	12	C. positivo
Inhibición	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922				
	Volumen 50 µl				
(mm)	R	25,25 ± 0,18	23,0 ± 0,07	18,5 ± 0,00	56,0 ± 0,07
Zona (%)	-	37,25	32,65	23,47	100

Inhibición fue expresada en media ± desviación estándar. *R: Resistencia

Como se puede observar, la formación de los halos de inhibición de las BAL, se presenta solo en tres de las cepas (L, D y 12) (Figura 9), presentando una zona mayor en la cepa L con valor de 37,24%; sin embargo, no es una zona elevada de inhibición frente al patógeno *Escherichia coli* ATCC 25922. La acción del antibiótico es confirmada en el control positivo con un halo de 56 mm. Se evidencia que la actividad antimicrobiana de las células de L, D y 12 es inferior al efecto del antibiótico, pero es clave no perder de vista que en algunos casos cepas patógenas como *E. coli* han presentado resistencia a antibióticos, aunque no es el caso de *E. coli* ATCC 25922 frente al ciprofloxacino.

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

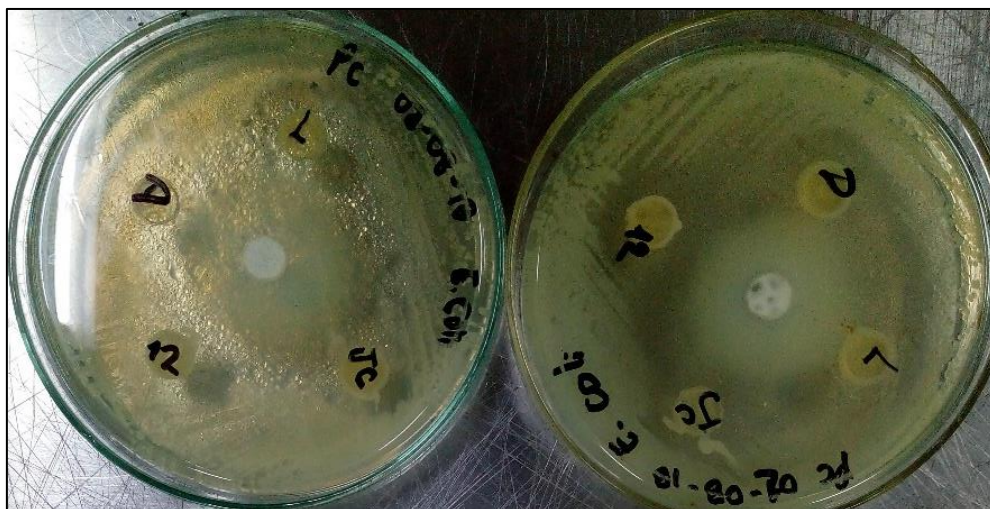


Figura 9. Ensayo de inhibición en presencia de células BAL contra *Escherichia coli* ATTC 25922.

4.4.2. Método de pocillos

Los resultados adquiridos en la evaluación de las BAL en ausencia de células se presentan en la tabla 5:

Tabla 5. Zona de inhibición de las BAL con el método de difusión de pocillos

BAL	JC	L	D	12	C. positivo
Inhibición	<i>Escherichia coli</i> ATTC 25931				
	Volumen 50 µl				
	R	20,0 ± 0,14	18,3 ± 0,04	R	54,25 ± 0,11
Zona (%)	-	27,51	23,92	-	100

Inhibición fue expresada en media ± desviación estándar. *R: Resistencia

Las sustancias producidas (ácidos orgánicos) por las cepas L y D se destacan por su actividad antimicrobiana inhibiendo *Escherichia coli* ATCC 25922, mientras que los metabolitos de la cepa 12 no inhibieron al patógeno, la cepa JC al igual que en el método anterior no tuvo actividad bactericida. Por lo que se infiere que los metabolitos producidos por cada BAL son diferentes y se considera que la actividad antimicrobiana es dependiente de la cepa y no es una característica que se le confiera a un grupo de BAL procedentes de un mismo origen. La acción del control positivo se reafirma en este método (Figura 10).

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

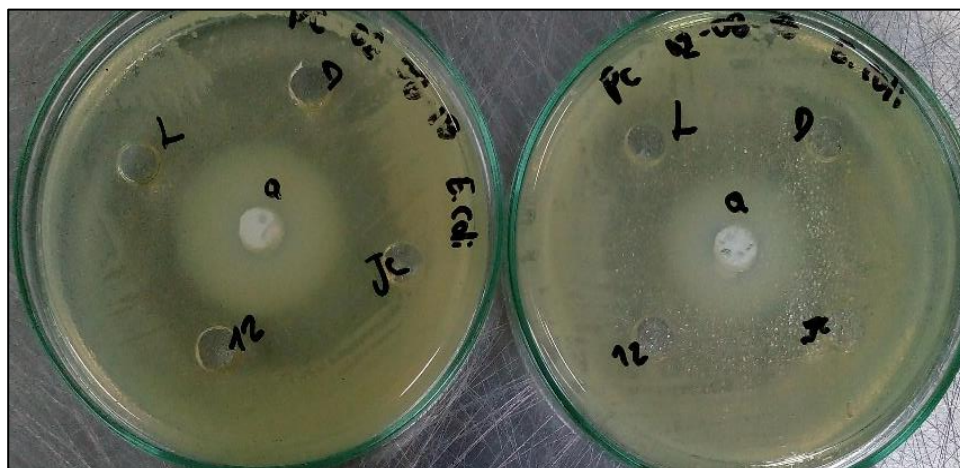


Figura 10. Ensayo de inhibición en ausencia de células BAL contra *Escherichia coli* ATTC 25922.

En la investigación realizada por Leal, *et.*, (2017) evalúan BAL obtenidas de quesillo y yogurt artesanal y comercial del Huila-Colombia frente a *E. Coli*, en el método de presencia de células obtienen los mayores diámetros de inhibición variando entre 10-17,7 mm, lo cual es confirmado en el ensayo *in vitro* realizado en esta investigación, coincidiendo que las zonas de mayor inhibición se muestran en presencia de células, L, D y 12 con porcentajes de 37,26%, 32,65% y 23,475 respectivamente (Figura 11), sin embargo; los ácidos orgánicos de las cepas L y D también inhibieron el crecimiento del patógeno *E. coli* en la metodología de ausencia de células. La literatura resalta la importancia de la presencia de células para adherirse y colonizar las células epiteliales del antro del estómago y de este modo competir con patógenos como *E. coli* o *H. pylori*, con el fin de mejorar la tasa de erradicación del patógeno. (Aiba et al., 1998).

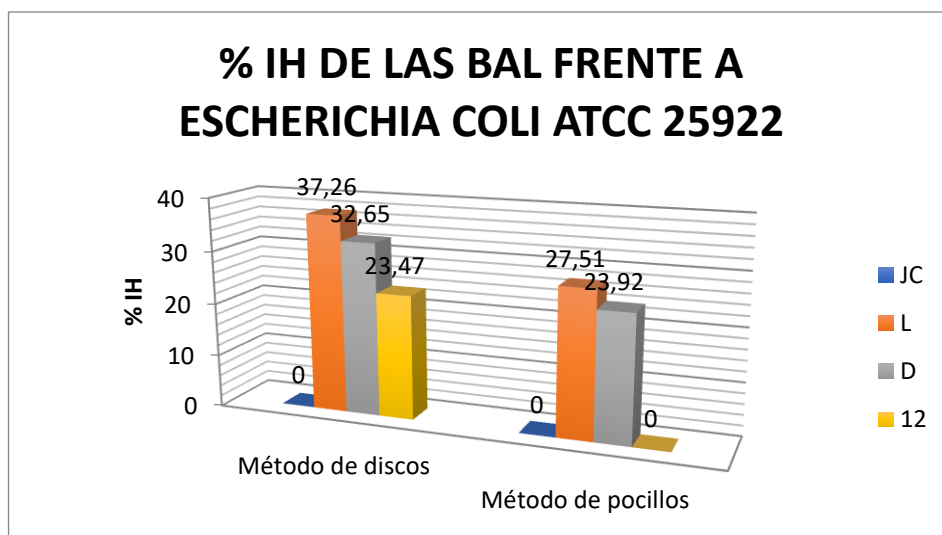


Figura 11. Porcentajes de inhibición en presencia y ausencia de células de BAL frente *E. coli* ATTC 25922.

%IH: Porcentaje de inhibición

u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

De acuerdo al análisis estadístico, ANOVA multifactorial aplicado a los factores BAL y método, los 3 valores-P que se observan en la tabla 6 son <0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre %IH con un 95,0% de nivel de confianza. Por lo que se infiere que el efecto antimicrobiano de las BAL frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 presenta diferencias significativas ($p < 0.05$) entre BAL y métodos.

Tabla 6. Valor-P de los factores BAL y método

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

En la figura 12 se evidencian las medias del porcentaje de inhibición en cada uno de los métodos, donde se observa que la presencia de las células de las cepas BAL evaluadas resultaron ser más efectivas que los ácidos orgánicos en la inhibición de *E. coli*, siendo el método de discos, el método con mayor porcentaje de inhibición con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

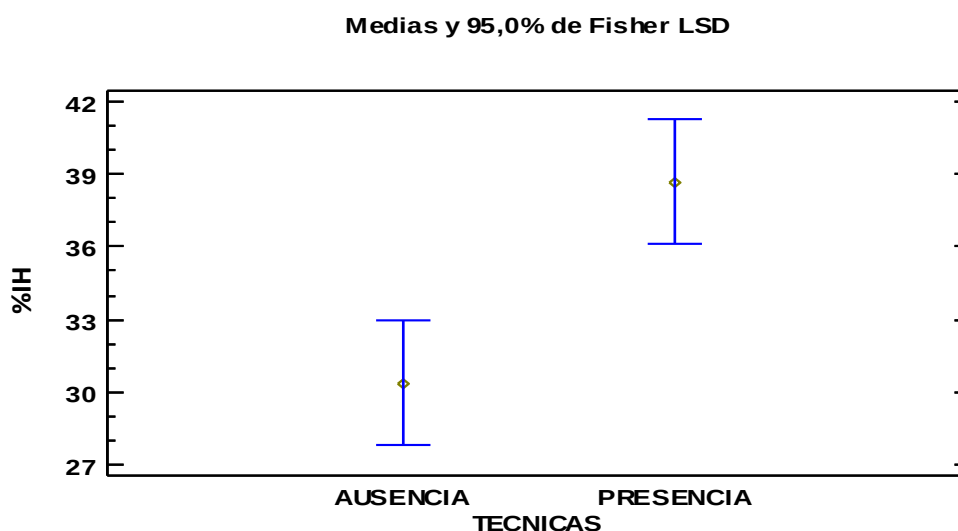


Figura 12. Medias del %IH de las BAL con los métodos de difusión

En la figura 13 se evidencia el comportamiento de cada una de las BAL evaluadas respecto al control positivo Ciprofloxacina con los métodos de difusión. De esta manera se comprueba que las BAL muestran mayor grado de inhibición en el método de difusión de discos; por tanto, la cepa láctica que más destaca en el ensayo es la obtenida de la fermentación del café L, demostrando resultados favorablemente altos tanto en el método de discos (presencia) como en el método de pocillos (ausencia).

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

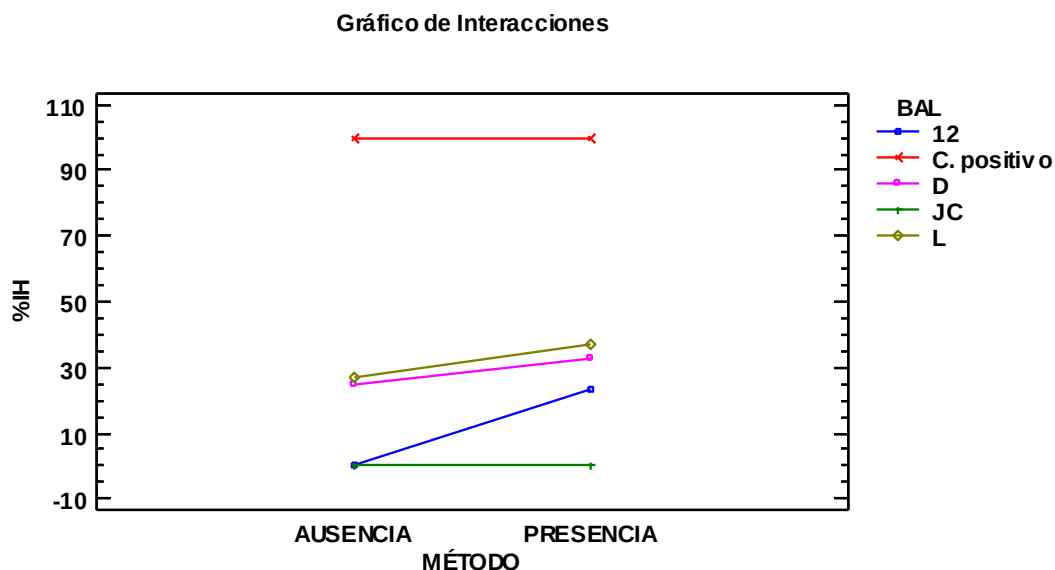


Figura 13. Interacciones de las BAL entre los métodos.

Destacar que el efecto antimicrobiano que tienen las cepas BAL en estudio frente al patógeno *Escherichia coli* ATCC 25922 es dependiente de estas, por lo que no se le puede atribuir que todas las cepas nativas obtenidas de leche materna, café y quesillo tengan la misma actividad antimicrobiana frente al patógeno *Escherichia coli* ATCC 25922. Los ensayos realizados son cualitativos; sin embargo, pueden ser de utilidad en futuras investigaciones *in vivo*.

Para conocer el potencial probiótico de una BAL, es importante determinar la capacidad bactericida frente a microorganismos patógenos. Las BAL diferentes mecanismos que generan antagonismo con otros microorganismos, como la reducción del pH, producción de biocinas, competencia por nutrientes y metabolitos como el ácido láctico, acético, peróxido, entre otros (Ramírez, *et al.*, 2005; Tambekar, *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos muestran que las células de las cepas lácticas (L, D y 12) inhiben *Escherichia coli* ATCC 25922 en condiciones *in vitro*, mientras que, en el método de pocillos, los ácidos orgánicos que inhiben *E. coli* ATCC 25922 son los aislados de la fermentación del café (L y D). Jurado, *et al.*, 2015 en un estudio relacionado encontró que *Lactobacillus lactis* ATCC 11454 inhibe *Escherichia coli* ATCC 25922 con halos alrededor de 2,6 cm en medio comercial MRS, lo que muestra gran similitud con el ensayo realizado. En otras investigaciones *E. coli* es susceptible a bacteriocinas producidas por *L. plantarum* y *L. lactis* (Sankar, *et al.*, 2012; Rajaram, *et al.*, 2010). Tambekar, 2009 también menciona que el proceso de fermentación que involucró *L. plantarum* tenía un amplio espectro inhibidor antimicrobiano frente a *E. coli* además de otros patógenos como *Salmonella typhi*, y *S. aureus*.

Por otro lado, los ensayos realizados permitieron identificar las cepas nativas de mayor poder antimicrobiano; destacando las obtenidas de la fermentación del café L y D que lograron inhibir en mayor proporción al microorganismo patógeno con diámetros de

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

inhibición de 2,5 y 2,3 cm respectivamente, estos valores son superiores a los publicados por Narvaéz, *et al.*, 2017, que obtiene 1,4 y 1,6 cm de las cepas nativas QR2 y QJ2 aisladas de queso de leche de cabra, además de una producción de ácido láctico de 0,9 y 0,74% respectivamente a las 48 h.

Autores como Rodríguez y García-Godos (2017), observan que sus BAL aisladas de chicha de molle producen sustancias antimicrobianas capaces de inhibir patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y la levadura *Candida albicans*, con diámetros de 14 mm, 15 mm, 15 mm y 14 mm respectivamente. Otros hallazgos, como los publicados por Cervantes (2019), encuentran que el 50% de cepas BAL aisladas de aguamiel, pulque y zarzamora tuvieron actividad inhibitoria frente *E. coli* y *S. aureus*, mostrando mayor inhibición frente a ambos patógenos la cepa P24-2 identificada como *L. Plantarum* JCM 1149 con un halo de $3,33 \pm 0,35$ cm.

Investigaciones anteriores realizadas por Cortés-Gaona, *et al.*, (2021) y Jimenez-Espinosa *et al.*, (2021), muestran la capacidad antagónica que tienen estas cepas nativas aisladas de productos de la región del Huila-Colombia para inhibir a otros patógenos como *Shigella sonnei* ATCC 25931 y *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977, es por eso que es importante hacer una identificación molecular, además identificar y cuantificar los diferentes ácidos orgánicos que se encuentran en estas BAL; estos resultados serán trascendentales para futuras investigaciones en pruebas *in vivo*.

4.5. Antibiógramas

El ensayo realizado presenta la susceptibilidad de cada una de las cepas nativas frente a 3 diferentes antibióticos. En la tabla 7 y figura 14 se evidencian los resultados:

Tabla 7. Susceptibilidad de las BAL frente agentes antimicrobianos.

BAL	JC	L	D	12
Antibiótico	Volumen 50 µl			
	Inhibición (mm)			
K	28,250 ± 0,106	36,500 ± 0,353	55,000 ± 0,212	46,000 ± 0,848
P	34,250 ± 0,247	28,500 ± 0,565	41,250 ± 0,318	39,750 ± 0,318
S	33,250 ± 0,035	26,000 ± 0,212	32,750 ± 0,247	39,000 ± 0,070

Susceptibilidad de las BAL frente agentes antimicrobianos esta expresada en media ± desviación estándar. Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200.000 U.I.). **P**: Ceftriaxona (Nirlife-Aculife). **S**: Ciprofloxacino (Benemid-Bioquimico pharma S.A).

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

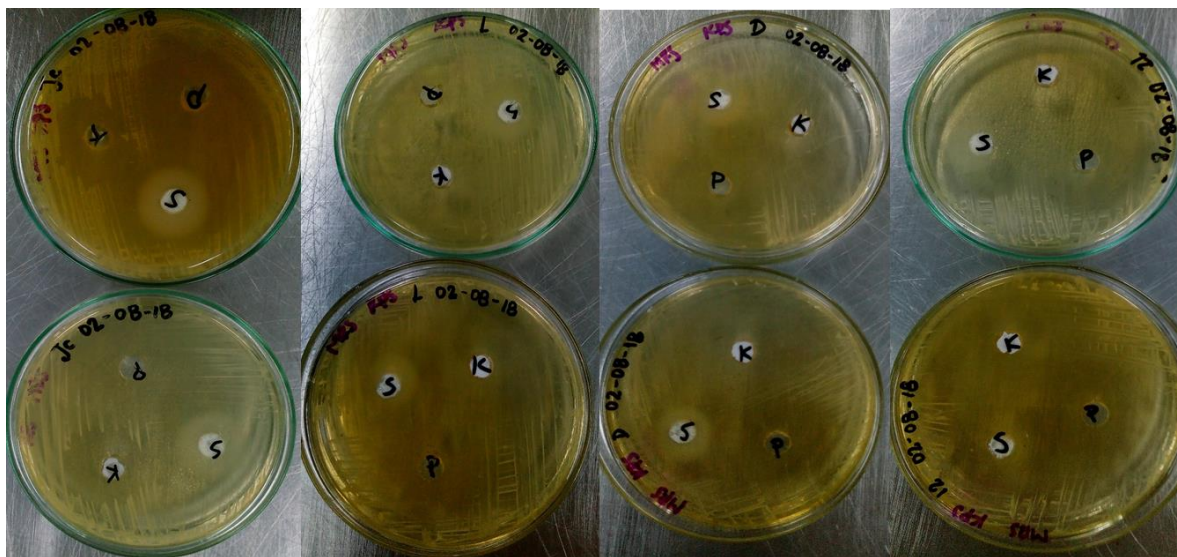


Figura 14. Evaluación de los antibiogramas de BAL frente antibióticos.

Luego de realizar el procedimiento descrito por Bauer, *et al.*, 1966, los resultados arrojados pasadas las 15 horas de incubación indican que las 4 cepas nativas presentan halos de inhibición alrededor de los pocillos impregnados, demostrando susceptibilidad frente a los antibióticos evaluados. Cada una de las BAL muestra diferentes perfiles susceptibles, siendo la mayoría más sensibles al antibiótico K (Penicilina), la cepa JC fue la de mayor prevalencia en resistencia a este antibiótico y D la más susceptible con un halo de inhibición de 55 mm. Por su parte la cepa L mostró menor susceptibilidad al antibiótico S (Ciprofloxacino) y P (Ceftriaxona) con halos de inhibición de entre 26 y 28 mm respectivamente. Gad y colaboradores (2014) en sus resultados, infieren que los de mayor prevalencia de resistencia a la Penicilina se presenta entre los aislados de *Lactobacillus* spp., de esta manera se corrobora la acción de *Lactobacillus acidophilus* que es la caracterización fenotípica de la cepa JC. Autores como Jurado, H., Guzman, M., (2015) encuentran que BAL del género *Lactobacillus casei* presentan resistencia a la Penicilina.

Debido a la incorrecta utilización o uso excesivo de antibióticos, algunos microorganismos han desarrollado cierta capacidad adaptativa generando mecanismos que les permiten sobrevivir al ataque (Oteo, 2016). Es por eso que los resultados de este ensayo son relevantes para el uso de BAL como alternativa en tratamientos. Según Amoroch (2011), este criterio es importante para la selección y aseguramiento del uso de nuevas cepas probióticas en posibles aplicaciones como adyuvante en tratamientos de infecciones gastrointestinales, además de descartar la posibilidad de transmisión de genes resistentes a microorganismos patógenos que puedan afectar el ecosistema digestivo (May-Torruco, *et al.*, 2020).

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amoroch@usco.edu.co

4.6. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD Y ESTABILIDAD DE BAL EN CONDICIONES SIMULADAS GÁSTRICAS A pH ÁCIDO Y ALCALINO “*In vitro*”

Los resultados previos han demostrado el potencial antimicrobiano que tienen las BAL aisladas de la fermentación del café y la elaboración de quesillo (L, D y 12), frente al patógeno de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922, además de mostrar sensibilidad frente a unos antibióticos, lo cual las hace de gran interés. Sin embargo, la supervivencia al paso por el tracto gastrointestinal es una prueba fundamental en la selección de probióticos (FAO y OMS, 2001, tomado de Amorocho-Cruz CM, 2011).

Es por eso que en este ensayo *in vitro* se evalúa la viabilidad de las BAL exponiéndolas a diferentes condiciones de pH, se comprobó mediante el recuento en placa.

En los resultados se encuentra que después de 3 horas de exposición a pH 2.0 las cepas JC, L y D (Figuras 15 a 17) solo se muestran viables hasta el tiempo de 40 min, por otro lado, la cepa 12 resistió solo 5 min (Figura 18). Con el procedimiento que discrimina entre medias, LSD de Fisher, se logró establecer si existían diferencias significativas ($p < 0.05$), encontrándose que entre la muestra control, la muestra al tiempo 0 y de 180 min de la cepa JC existen diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95,0%. Mientras que en las cepas L, D y 12 existen diferencias significativas entre la muestra control y la muestra tomada al tiempo de 180 min. En general estas cepas fueron afectadas significativamente por el pH ácido, la mayoría mostrando pérdida de viabilidad después de 40 min de estar expuestas a pH 2.0. El recuento en placa mostró valores entre 2.0 - 3.5 Log UFC/ml para las cepas JC, L, D.

Tras el ensayo realizado a pH 8.0 todas las cepas muestran sobrevivir después de 360 minutos (Figuras 15 a 18) pasando de valores de 10^8 , 10^6 , 10^8 y 10^7 a 10^7 , 10^5 , 10^7 y 10^6 para JC, L, D y 12 respectivamente. El recuento en placa mostró valores entre 4,55 – 7,94 Log UFC/ml. Todas las cepas lácticas ensayadas frente a las condiciones intestinales disminuyeron su viabilidad levemente respecto de la muestra control, la prueba LSD de Fisher muestra diferencias significativas entre la muestra control y la muestra al final del tratamiento (360 min) de las cepas JC, L y D.

En general, las cepas en estudio se mostraron más sensibles a las condiciones simuladas gástricas (pH 2,0) que a las intestinales (pH 8,0).

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

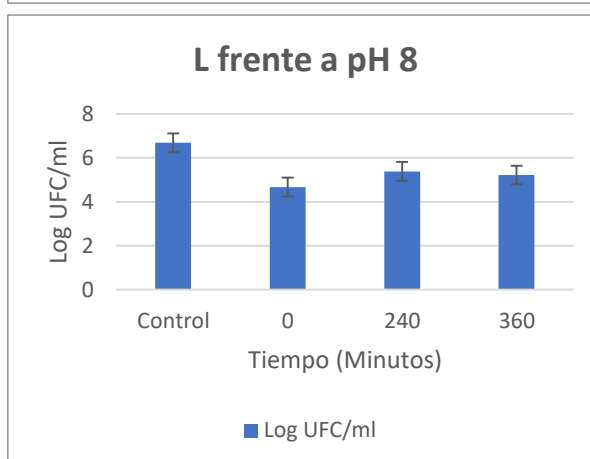
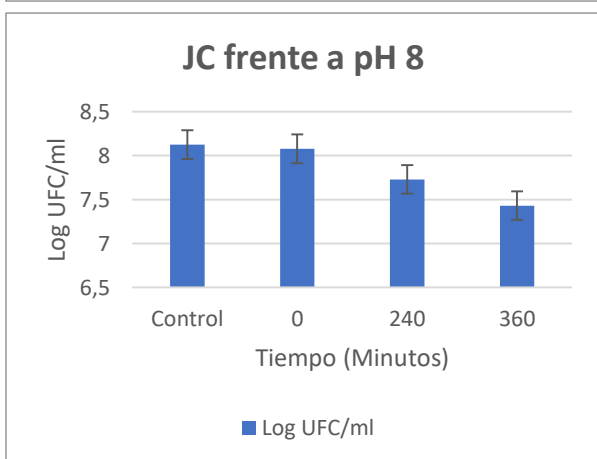
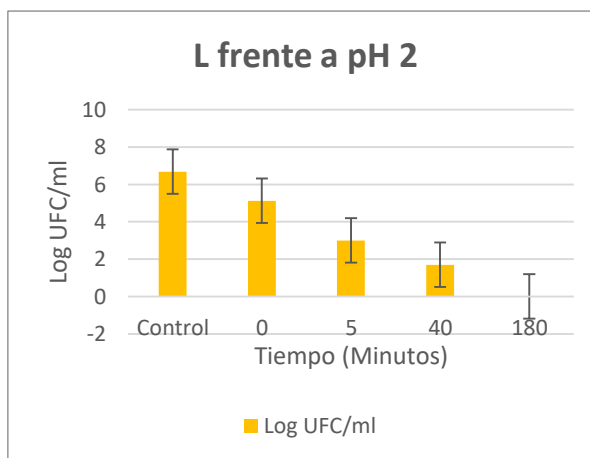
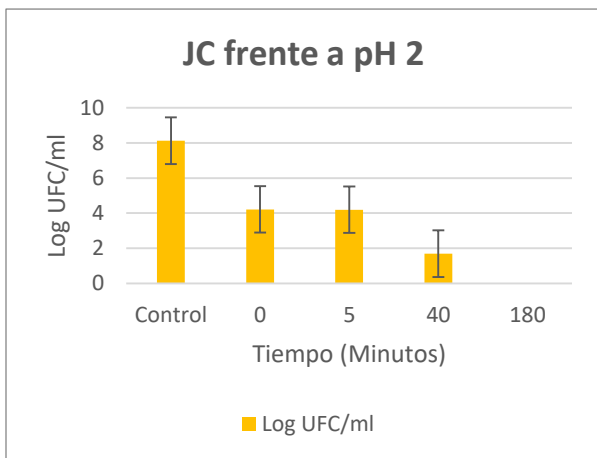


Figura 15. Supervivencia al tránsito gastrointestinal de la cepa JC por recuento en placa.

Figura 16. Supervivencia al tránsito gastrointestinal de la cepa L por recuento en placa.

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

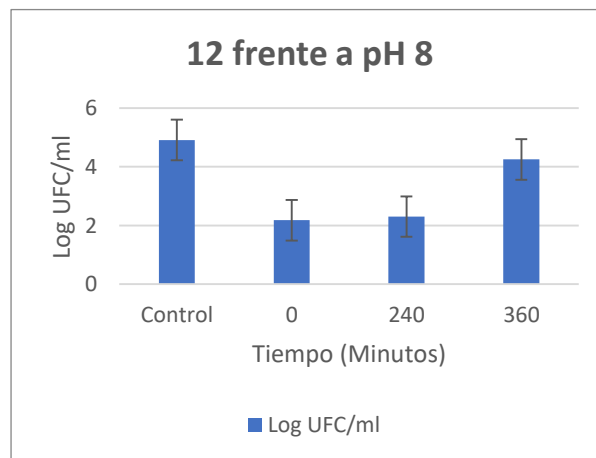
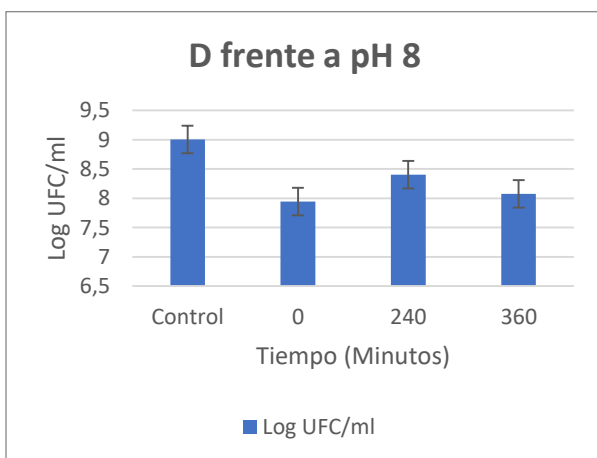
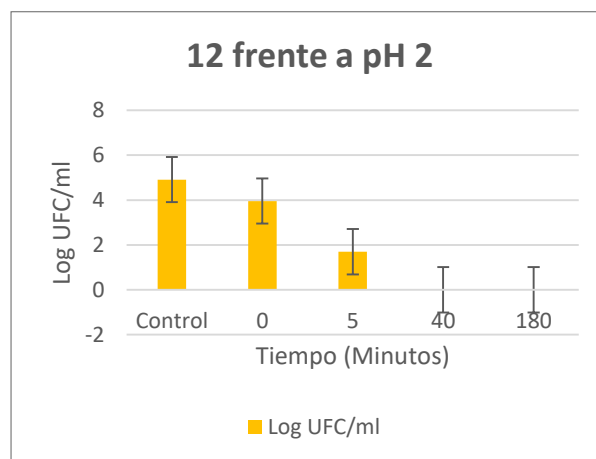
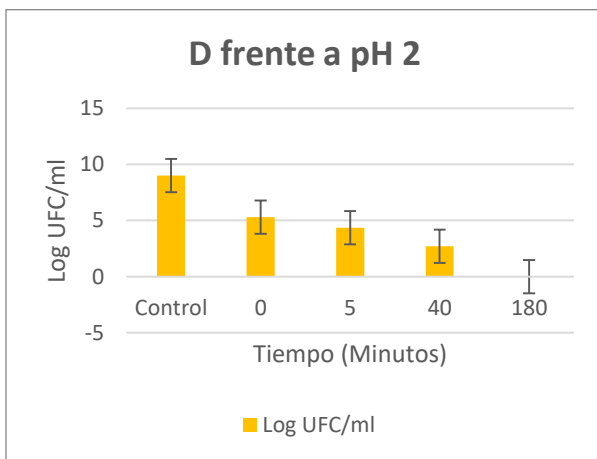


Figura 17. Supervivencia al tránsito gastrointestinal de la cepa D por recuento en placa.

Figura 18. Supervivencia al tránsito gastrointestinal de la cepa 12 por recuento en placa.

La FAO/OMS en el 2002, recomienda que después de haber pasado por el tránsito gastrointestinal, los probióticos deben mantener una concentración mínima de 10^6 UFC/ml para asegurar que el probiótico pueda adherirse a la mucosa intestinal, colonizar y así realizar su acción benéfica en el huésped, por lo que al inicio del tránsito se debe disponer de cultivos celulares en concentraciones superiores (Lin, *et al.*, 2006).

Según los resultados, para que estas bacterias puedan ejercer su función probiótica, se sugiere ser consumidas en ayuno (Estómago vacío) de forma líquida, ya que el paso de estas por el tracto será más ligero si se hace antes de consumir cualquier otro alimento, disminuyendo el tiempo de exposición a estas condiciones (Huang, *et al.*, 2004; Collado, 2004). También se podría aumentar la concentración del inoculo inicial (Amorocho-Cruz CM, 2011). Rodríguez *et al.*, (2016) mencionan otra alternativa, la de encapsular las BAL para protegerlas de condiciones adversas, como la acidez del estómago, de esta forma favorece e incrementa su viabilidad.

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

Las bacterias que son capaces de resistir condiciones ácidas es porque desarrollan mecanismos de supervivencia como el bombeo de protones, protección de macromoléculas, formación de biopelículas, entre otros, destacándose entre estas las del género *Lactobacillus* (Liu *et al.*, 2015), concordando con los resultados encontrados en la investigación realizada por Jurado, *et al.*, (2015) donde muestran la viabilidad de la cepa láctica a condiciones ácidas, con poblaciones adecuadas para colonizar el tracto digestivo, también infiere en que los *Lactobacillus* son considerados acidúricos debido a que crecen a pH inferiores a 5, es por eso que su capacidad de resistencia a estos valores se debe a mecanismos celulares que le permiten mantener el pH interno cerca de la neutralidad.

Rodríguez-López (2021) en estudios relacionados, encontró en su ensayo que la cepa de *L. plantarum* JCM 1055 y los aislados *L. plantarum* A19, A26 y C16 presentaron viabilidad después de estar expuestos a un pH ácido (pH 2.5), estas mismas cepas también se mostraron tolerantes en presencia de sales biliares.

De esta manera, los valores obtenidos, prueban la importancia de una buena cantidad de probióticos en su ingestión al inicio de un tratamiento bioterapéutico para competir frente a microorganismos patógenos como es el caso de *E. coli* ATCC 25922, ya que una elevada población permitirá la colonización del tracto gastrointestinal.

5. CONCLUSIONES

Las BAL obtenidas de productos de la región del Huila-Colombia, presentan parámetros de crecimiento adecuado en condiciones *in vitro*, además, cuenta con mecanismos para inhibir el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 y evita el riesgo de transmitir genes de resistencia a antibióticos.

La simulación de las condiciones gástricas con diferentes pH, permitió establecer que las BAL L y D aisladas de la fermentación del café podrían resistir el paso a través del tracto gastrointestinal si se consumen en cantidades mayores a las utilizadas en este estudio.

6. RECOMENDACIONES

Para próximos estudios se recomienda la incubación en anaerobiosis para mejorar el crecimiento de las BAL, realizar pruebas específicas de biología molecular para su respectiva identificación. También es necesaria hacer la prueba de adherencia al epitelio intestinal y dar continuidad a este estudio en condiciones *in vivo*.

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Agudelo, C., Ortega, R., Hoyos, J. L. (2010). Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 y Bacterias ácido lácticas de yogurt. Facultad de ciencias Agropecuarias. Vol. 8 No. 2.

Agudelo, E., Gutiérrez, L., Bedoya, O., Montoya, O. (2016). Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de cepas ácido lácticas comerciales, sobre bacterias causantes de mastitis bovina. Revista Alimentos Hoy, Revista de la asociación colombiana de ciencia y tecnología de alimentos. Vol. 24, No 38. Pág. 79.

Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A., Takagi, A., Koga, Y. (1998). Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. American Journal of Gastroenterology. Vol. 93 - Issue 11 - p 2097-2101. DOI: 10.1111/j.1572-0241.1998.00600.x

Amorocho, C., (2011). Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra. (Tesis doctoral). P 68-74. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. <https://doi.org/10.4995/thesis/10251/13830>

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. Vol. 45, número 4, págs. 493–496. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493

Cervantes-Elizarrarás, A., Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E., Vega-Sánchez, V., Velásquez-Guadarrama, N., Zafra-Rojas, Q., Piloni-Martini, J. (2019). In Vitro Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Aguamiel and Pulque and Antibacterial Activity Against Pathogens. Applied Sciences 9, no. 3: 601. <https://doi.org/10.3390/app9030601>

Collado, M.C., 2004. Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Tesis Doctoral. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.

Cortés-Gaona, Ma. P., Amorocho-Cruz, C. M., (2021). Bacterias ácido lácticas y extractos de moringa oleifera como alternativa para contrarrestar shigella sonnei ATCC 25931. Revista Facultad de Ingeniería. Universidad de Antioquia. DOI: 10.17533/udea.redin.20210958

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M. M., Finlay, B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. Vol. 26(4). Págs. 822- 880. Doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>

De la Fuente-Salcido, N., Villarreal-Prieto, J., Díaz, L., García, A. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas. Vol. 46. No. 2.

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

Escobar, Luis F., Rojas, C. A., Giraldo, G. A., Padilla, L. (2010). Evaluation of *Lactobacillus casei* growth and production of lactic acid using as substrate the whey of bovine milk. *Rev. Invest. Univ. Quindío* (20): 42 - 49. Armenia – Colombia

Estrada, A., Gutiérrez, L., Montoya, O., (2005). Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 58(1).

Fahrurrozi, Rahayu, E. P., Nugroho, I. B., Lisdiyanti, P. (2019). Lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented cocoa beans prevent the growth of model food-contaminating bacteria. *AIP Conference Proceedings* 2099, 020005. Doi: <https://doi.org/10.1063/1.5098410>

Gad, G. F., Abdel-Hamid, A. M., Farag, Z. S., (2014). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(1): págs. 25–33. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100005>

Gómez, E. G. (2013). Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas (BAL), aisladas de una bebida fermentada tradicional de Chiapas (taberna). (Tesis Pregrado). Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Gonzalez, T., Rojas, R., (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Unidad Sureste del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. Guadalajara, Jalisco, México.

Heredia-Castro, P., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A., Vallejo-Córdova, B., (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Asociación Interciencia. Sistema de Información Científica Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. Vol. 42. No. 6. Págs. 340-346.

Huang, Y., Adams, M.C., (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 91. No. 3. Págs. 253– 260. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.001>

Jackson, M.S., Bird, A. R., McOrist, A.L. (2002). Comparison of two selective media for the detection and enumeration of *Lactobacilli* in human feces. *Journal of Microbiological Methods*, 51, P 313–321. Doi: 10.1016 / s0167-7012 (02) 00102-1

Jiménez-Espinosa, K. J., Amorocho-Cruz, C. M., (2021). Evaluación de la actividad antibacteriana de bacterias ácido lácticas (BAL) y poder inhibitorio de extractos de hojas de moringa deshidratadas frente a la cepa de referencia (*Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977). (Tesis Pregrado). Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia.

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

Jurado-Gómez, H., Calpa-Yamá, F., Chaspuengal-Tulcán, A., (2014). Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos. *Veterinaria y Zootecnia* ISSN 2011-5415; 8(2): 15-35. DOI: 10.17151/vetzo.2014.8.2.2

Jurado-Gómez, H., Jarrín-Jarrín, V. (2015). Cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas. *Revista Biosalud*; 14(2): 49-62. DOI: 10.17151/biosa.2015.14.2.5

Kaban, G., Kaya, M. (2006). Effect of starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in sucuk. *Food Control*, v.17, n. 10, p.797-801. doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.05.003

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

Leal, B., Amorcho, C., (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias lácticas aisladas de productos lácteos comerciales frente a *Escherichia coli*. *Journal usco. Ingeniería y Región*, ISSN 1657-6985, N°. 18, págs. 45-52. <https://doi.org/10.25054/22161325.1206>

Lin, W., H, Hwang, C. F., Chen, L. W., Tsen, H. Y. (2006). Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol.* Vol. 23. No (1) Págs. 74-81. Doi: 10.1016/j.fm.2005.01.013.

Liu, Y., Tang, H., Lin, Z., Xu, P. (2015). Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. *Biotechnology Advances.* Vol. 33 (7). Págs. 1484-1492. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.06.001>

López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, Vol 3(1), P 10-18.

May-Torruco, A. L., Corona-Cruz, A. I., Luna-Jiménez, A. L., González-Cortés, N., Jiménez-Vera, R. (2020). Sensibilidad y resistencia a antibióticos de cepas probióticas empleadas en productos comerciales. *European Scientific Journal.* Vol.16, No.18 ISSN: 1857-7881. Doi:10.19044/esj.2020.v16n18p43

Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., Ochoa, T., (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* Vol. 28. No. 4. Págs. 648-456. Doi: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.284.430>

Narváez, B., Cruz, M., Hernández, F., Flores, M., Martínez, D., Rangel, S. (2017). Selection of lactic acid bacteria from Coahuila artisanal goat cheese for their use as starter

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorcho@usco.edu.co

cultures. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Investigación y Ciencia, vol. 25, núm. 72, pp. 45-52.

Oteo, J. (2016). La resistencia a los antibióticos, La amenaza de las superbacterias. CATARATA, Instituto de Salud Carlos III. Madrid. Pág 31-33. <https://doi.org/10.4321/repisalud.7273>

Rajaram G, Manivasagan P, Thilagavathi B, Saravanakumar A. Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* Isolated from Marine Environment. Advance Journal of Food Science and Technology 2010; 2(2):138-144.

Ramírez-Cuenca, M. S. (2005). Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

Ramírez-López, C., Vélez-Ruiz, J. F. (2016). Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. Información tecnológica. Vol. 27(6), 115-128. Doi: 10.4067/S0718-07642016000600012

Rodríguez, J., García-Godos, P. (2019). Capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle. Rev. Soc. Quím. Perú, vol.83, n.4, pp.391-402.

Rodríguez-López, C. M., Guzmán-Beltrán, A. M., Lara-Morales, M. C., Castillo, E., Brandão, F. B. (2021). Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* spp. (LACTOBACILLACEAE) resistentes a Cd(II) y As(III) recuperados de fermento de cacao. Acta Biológica Colombiana. 26(1). Págs. 19-29. Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v26n1.83677>

Rodríguez, Y., Rojas A., Rodríguez-Barona, S. (2016). Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. Revista Biosalud. Vol. 16. No. 2. Págs. 106-115 DOI: 10.17151/biosa.2016.15.2.10

Salazar, A., Montoya, O., (2003). Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud humana. Vitae Redalyc, Revista de la facultad de química farmacéutica. Vol. 10. No. 2. Págs. 20-26.

Sankar N, Priyanka D, Reddy P, Rajanikanth P, Kumar K, Indira M. Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus Plantarum* Isolated from Cow Milk. Inter. J. Microbiol. Res. 2012; 3(2):133-137.

Sauca, G., Gallés, C., Gasós, M., (1997). Evolución de la sensibilidad de *Escherichia coli* a 6 antimicrobianos durante los últimos 12 años. Revista atención primaria. Vol. 19. No. 5. Págs. 226-229.

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co

Soto, Z., Pérez, L., Estrada, D., (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. Revista Salud Uninorte. Salud, Barranquilla. Vol.32 no.1. Pág. 1.

Tafur, J. D., Torres, J. A., Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. Infectio, Revista de la asociación colombiana de infectología. Vol. 12. No. 3.

Tambekar, D., Bhutada, S., (2009). Studies on Antimicrobial Activity and Characteristics of Bacteriocins Produced by Lactobacillus strains Isolated from Milk of Domestic Animals. The Internet Journal of Microbiology. Vol. 8, Number 2.

Taroco, R., Seija, V., Vignoli, R., (2008). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Capítulo 36 Chapingo, México.

Zamudio-Vázquez, V. P., Ramírez-Mayans, J. A., Toro-Monjaraz, E. M., Cervantes, R., Zárate-Mondragón, F., Montijo-Barrios, E., Cadena-León, J. F., Cázares-Méndez, J. M. (2017). Importancia de la microbiota gastrointestinal en pediatría. Acta pediátrica de México. Vol. 38. No. 1, Págs. 49-62. Doi: <http://dx.doi.org/10.18233/APM1No1pp49-621323>

8. ANEXOS

8.1. Tampón Fosfato Salino (PBS) 3X

COMPUESTO	CANTIDAD
NaCl	22,8 g
NaH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	2,88 g
Agua destilada	1 L
pH	7,5

Las sales se disuelven por separado. Luego, se esteriliza a 115 °C durante 15 minutos.

PBS 1X

Diluir 3 veces el tampón PBS 3X en agua destilada. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos (Amorocho-Cruz CM, 2011).

¹Estudiante de Ingeniería Agrícola, Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: u20151134105@usco.edu.co

²Ph.D Biotecnología., docente planta Universidad Surcolombiana, Investigador del Centro Surcolombiano de Investigación en Café CESURCAFÉ. Universidad Surcolombiana. Neiva-Huila-Colombia. Email: claudiamilena.amorocho@usco.edu.co