

**Aislamiento e identificación de bacterias del
género *Enterococcus spp.* en quesos
artesanales utilizando la reacción en cadena
de la polimerasa**

Melvin Rodríguez Vásquez

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2009

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Aislamiento e identificación de bacterias del
género *Enterococcus spp.* en quesos
artesanales utilizando la reacción en cadena
de la polimerasa**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Melvin Rodríguez Vásquez

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2009

Aislamiento e identificación de bacterias del género *Enterococcus spp.* en quesos artesanales utilizando la reacción en cadena de la polimerasa

Presentado por:

Melvin Rodríguez Vásquez

Aprobado:

Edgar E. Ugarte, M.Sc.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria Alimentaria

Marcelino Guachambala, Ing.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

RESUMEN

Rodríguez, M. 2009. Aislamiento e identificación de bacterias del género *Enterococcus spp.* presentes en quesos artesanales utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa. Proyecto de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 34p.

Los lácteos y sus derivados son unas de las industrias más importantes y atractivas para Honduras. Los productores de lácteos hondureños en su mayoría son artesanales, los cuales no tienen métodos adecuados para la producción, lo que dificulta encontrar nichos de mercados nacionales e internacionales por los aspectos legales de sanidad que deben cumplir. Los quesos artesanales son preferidos por los consumidores por sus diferentes características sensoriales en color, sabor, textura, olor y cremosidad. Los quesos procesados por la industria láctea debido a los procesos de producción, los cuales aseguran la inocuidad a los consumidores, no presentan la mayoría de las características sensoriales que presentan los quesos artesanales. El objetivo de este estudio fue aislar e identificar bacterias en quesos artesanales hondureños utilizando medios selectivos y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se seleccionaron tres quesos artesanales de marcas de industrias lácteas artesanales de Honduras. Se logró aislar dos cepas fenotípicamente diferentes presentes en los tres quesos artesanales. Se identificaron tres cepas de *Enterococcus faecium* con primers SCAR Entero y FAC. Se realizó un análisis con 11 marcadores RAPD que permitieron identificar 83 polimorfismos de ADN; las distancias genéticas fueron estimadas usando el coeficiente de Dice y se generó un dendrograma mediante un análisis UPGMA, el cual mostró diferencias genotípicas entre las cepas identificadas. Las cepas aisladas e identificadas deben ser usadas en la elaboración de quesos para validar su potencial en la industria láctea.

Palabras clave: FAC, primers, RAPD, SCAR, UPGMA.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página	ii
Resumen	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
3. MATERIALES Y METODOS	8
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
5. CONCLUSIONES	22
6. RECOMENDACIONES.....	23
7. LITERATURA CITADA	24
8. ANEXOS	26

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadro

1.	Descripción de primers utilizados en PCR.	11
2.	Descripción de RAPD utilizados en la diferenciación de cepas.	12
3.	Protocolo de referencia para el marcador Entero. Tamaño de banda 400pb	12
4.	Perfil térmico de referencia para el marcador Entero	13
5.	Pruebas realizadas con el protocolo de referencia para el marcador Entero	13
6.	Protocolo de referencia para el marcador FAC. Tamaño de banda de 1000pb	14
7.	Pruebas realizadas con el protocolo de referencia para el marcador FAC	14
8.	Perfil térmico de referencia para el marcador FAC.	15
9.	Concentración inicial de ADN de las 6 cepas aisladas.....	17
10.	Protocolo optimizado para el marcador Entero.....	17
11.	Perfil térmico seleccionado para el marcador Entero.....	18
12.	Protocolo optimizado para el marcador FAC	18
13.	Perfil térmico seleccionado para el marcador FAC.....	18

Figura

14.	Método de aislamiento de cepas.	9
15.	Bacterias blancas y bacterias cremas aisladas de quesos artesanales.....	16
16.	Gel de los marcadores Entero y FAC. 1: escalera molecular, 2: cepa crema queso 1, 3: cepa crema queso 2, 4: cepa crema queso 3, 5: cepa blanca queso 1, cepa blanca queso 2, 7: cepas blanca queso 3, 8: cepa crema queso 1, 9: cepa crema queso 2, 10: cepa crema queso 3, 11: cepa blanca queso 1, 12 cepas blanca queso 2, 13: cepa blanca queso 3	19
17.	Diferenciación de cepas con marcadores RAPD	20
18.	Dendrograma realizado de los resultados del análisis de los 11 marcadores RAPD.....	21

Anexo

19.	Indicaciones para Agar Enterococcosel.....	27
20.	Indicaciones para Universal Preenrichment Broth.....	27
21.	Rehidratación de primers	27
22.	Protocolo de extracción de ADN con proteinasa K.	27

23. Reactivos usados para la extracción de ADN de las cepas..... 28

1. INTRODUCCIÓN

Los lácteos y sus derivados son unas de las industrias más importantes y atractivas para Honduras. El sector lácteo es el empleador rural más grande en Honduras, contribuye a la subsistencia de más de medio millón de hondureños, siendo la fuente más grande de ingresos (TechnoServer 2005). Los productores de lácteos hondureños en su mayoría son artesanales, que no tienen métodos adecuados para la producción, lo que dificulta encontrar nichos de mercados nacionales e internacionales por los aspectos legales de sanidad que deben cumplir.

Los quesos artesanales son preferidos por los consumidores por sus diferentes características sensoriales en color, sabor, textura, olor y cremosidad en comparación con los quesos procesados por la industria láctea los cuales debido a los procesos de producción, aseguran la inocuidad a los consumidores, pero pierden la mayoría de las características sensoriales, muchas de estas características son aportadas por las bacterias ácido lácticas que están presentes en los quesos artesanales.

En la actualidad la industria láctea hondureña busca alternativas para mejorar el sabor de los quesos y enfrentarse al reto de ser más competitivos, pues las nuevas tendencias del mercado exigen productos de alta calidad, libre de microorganismos patógenos y con características sensoriales atractivas para los consumidores preferiblemente con sabor a quesos artesanales.

Según Franz et al. (2003), los *Enterococcus* están asociados con los quesos tradicionales europeos fabricados en los países mediterráneos a partir de leche cruda o pasteurizada, y la fuente de los *Enterococcus* en la leche y el queso provienen de las heces de las vacas lecheras y del agua contaminada, de equipos de ordeño y de tanques de almacenamiento

El género *Enterococcus spp.* son cocos gram positivos que se agrupan como células individuales, en parejas o en cadenas cortas, no forman esporas y algunas células pueden ser móviles. Son anaerobios aerotolerantes, quimioorganotrofos con un metabolismo homofermentativo cuyo principal producto de la fermentación es ácido láctico y, además, pueden producir pequeñas cantidades de ácido acético, fórmico y etanol. No producen gas.

El objetivo de este estudio fue aislar e identificar bacterias del género *Enterococcus spp.* presentes en quesos artesanales utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Se aislaron seis cepas de tres quesos artesanales con medio de cultivo selectivo de las cuales tres fueron identificadas como *Enterococcus faecium* con primers SCAR Entero para género y el marcador FAC para especie.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Aislar e identificar *Enterococcus spp.* y *Enterococcus faecium* de tres quesos artesanales hondureños.

1.1.2 Objetivos específicos

- Obtener cepas aisladas del género *Enterococcus spp.* utilizando Agar Enterococcosel como medio selectivo.
- Identificar y comparar las cepas aisladas por medio de PCR.
- Obtener un banco de cepas aisladas de bacterias para usarlas en estudios posteriores.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GÉNERO *ENTEROCOCCUS*.

Los *Enterococcus* forman parte de las bacterias ácido láctico de importancia en los alimentos. Generalmente están en la maduración y el desarrollo del aroma de ciertos quesos y embutidos tradicionales, especialmente los producidos en la zona mediterránea. Los *Enterococcus* son también utilizados como pro bióticos humanos (Franz et al. 2003).

Los *Enterococcus* se encuentran en el tracto gastrointestinal humano, persisten en el medio extraenteral son omnipresentes en los procesos de transformación de alimentos están presentes en actividades deseables tales como: lipolíticas, estero líticas y en la utilización de citrato; y se encuentran en la producción de bacteriocinas, por lo tanto los *Enterococcus* se han aplicado a carnes y productos lácteos (Chang et al. 2005).

El género *Enterococcus spp.* ha tenido grandes cambios en la taxonomía durante los últimos años, el término *Enterococcus* fue utilizado por primera vez por Thiercelin (1899, 1903) para referirse a un diplococo Gram positivo encontrado en el intestino humano. La denominación de *Streptococcus faecalis* fue acuñada por Andrewer y Horder (1906), para designar a un microorganismo aislado de un paciente con endocarditis aludiendo el nombre específico al hábitat de dicho microorganismo, el intestino. Posteriormente Schleifer y Kilpper-Bälz (1984) utilizaron hibridación ADN-ADN y ADN-ARN para demostrar que *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* eran lo suficientemente distintos de resto de los *Streptococcus* como para poder ser transferidos a un género separado, el género *Enterococcus*. Basándose en la catalogación del gen ribosómico 16's de ARN y con las hibridaciones ADN-ADN y ADN-ARN, mas los estudios serológicos con antisueros anti-superóxido dismutasa, los *Streptococcus* en sentido amplio fueron divididos en tres géneros: *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* y *Lactococcus* (Franz et al. 2003).

Los *Enterococcus* junto con otros géneros de las bacterias ácido lácticas, pertenecen a la subdivisión clostridial de las eubacterias Gram positivas. Dentro de ésta, los *Enterococcus* se encuadran, junto con los géneros *Melissococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*, en la familia *Enterococcaceae* (Franz et al. 2003).

Los *Enterococcus* tienen una dimensión en μm de 0.6-2.0 x 0.6- 2.5; y las células son esféricas u ovoides en parejas o cadenas cortas, no esporuladas, a veces móviles, son facultativas, fermentan hidratos de carbono a lactato sin producción de gas, requerimientos nutricionales complejos, catalasa negativo (Klein 2004). Crecen a temperaturas de 35 ± 2 °C de 24 a 48 horas (Zimbro et al. 2003).

Renye (2008), identificó los *Enterococcus* de los quesos artesanales elaborados con leche cruda de cabra, para ser evaluados en las características organolépticas de los quesos elaborados con leche cruda de cabra. Muchas cepas de *Enterococcus* también son conocidas por producir péptidos antimicrobianos, enterocinas, que pueden impedir el crecimiento de ciertos organismos patógenos en alimentos, en el estudio de Renye (2008), se aislaron *Enterococcus faecium* y *Enterococcus duran* los cuales inhibieron el crecimiento de *Listeria spp.*

Las bacteriosinas se definen como proteínas bactericidas, que generalmente tienen una estrecha actividad dirigida con una especie de bacteria relacionada con la cultura de los productos. Las bacteriocinas son potencialmente útiles para la aplicación industrial como bioconservantes, bioreguladores de micro flora presentes en los alimentos fermentados, las bacteriocinas de los *Enterococcus* son clasificados como bacteriocinas clase II. (Chang *et al.* 2005).

2.2 ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO (ADN)

El ADN es una delicada cadena compuesta de cuatro tipos de desoxinucleótidos: desoxiadelenato (A), desoxitimidilato (T), desoxiguanilato (G), y desoxicilato (C). La secuencia de estas bases determina la información genética. Los ADN monocatenarios son raros; normalmente, parejas de cadenas con secuencias complementarias forman dobles hélices donde la A de una cadena se emparejan con las T de la otra, y las G con las C. En el interior de las células la hélice de ADN está a su vez enrollada y rodeada de diversas proteínas (Watson y Crick 1953).

Las bacterias son clasificadas como procariotas, que es una célula cuyo ADN no está delimitado por un núcleo. Un procariota no tiene aislado su material genético del resto de la célula por una membrana nuclear, tampoco posee nucléolo, ni aparato mitótico, y nunca configura una masa cromosómica definida.

La mayor parte de la información genética de una bacteria reside en una sola molécula de ADN circular de doble hebra, llamada genóforo, pero más comúnmente "cromosoma" o "cromatina" bacteriana (Stansfield 1992), el ADN circular de doble cadena esta, enrollado sobre sí mismo. Si bien se asocia la proteínas básicas, éstas no son verdaderas histonas (Prescott *et al.* 2004).

2.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Técnica desarrollada por Mullis en 1983. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es una técnica que a partir de una sola molécula puede generar duplicaciones de moléculas idénticas con el uso de reactivos, temperatura y el ADN que desea copiar (Mullis 1983).

Para efectuar la reacción en cadena de la polimerasa es necesario ADN original, cebadores o iniciadores de hibridación, una enzima catalizadora y bases nitrogenadas libres, los que presentan las siguientes características (Rodríguez y Barrera 2004):

ADN: provee la información genética de interés que desea amplificarse para lograr su visualización.

Cebadores o iniciadores son el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo de PCR. Su longitud suele estar entre 18 y 30 nucleótidos o pares de bases, y su contenido en G+C entre 40 – 75%. La concentración a las que se emplean en PCR está en el intervalo de 0.1 a 0.5 μM y son diseñados para ser exactamente complementarios a al molde de ADN (Rodríguez y Barrera 2004).

Enzima catalizadora: la Taq-polimerasa, es una enzima termoestable aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, elonga a partir los cebadores. Solo se puede utilizar polimerasas que sean capaces de actuar a las altas temperaturas empleadas en la reacción. (Sato *et al.* 1977).

Bases nitrogenadas libres deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) son cuatro: dATP, dTTP, dCTP y dGTP, son ladrillos con los que se construyen las nuevas cadenas de ADN. Los dNTPs son utilizados para extender la nueva cadena de ADN desde su acoplamiento a la original por acción de la Taq-polimerasa (Rodríguez y Barrera 2004).

Tampón: solución estabilizadora que contiene iones de potasio y magnesio con un pH aproximado de 8.4. el magnesio es un ion indispensable para que la Taq-polimerasa pueda cumplir sus funciones metabólicas y en un proceso *in vitro* pueda catalizar la reacción. Cambiando la concentración de Mg se puede controlar la actividad de la enzima Taq-polimerasa (Rodríguez y Barrera 2004).

Todos estos elementos se acoplan en el siguiente proceso:

Desnaturalización del ADN: los puentes se rompen dejando el ADN en forma de cadena sencilla, permitiendo así exponer las diferentes bases nitrogenadas para la hibridación con los oligonucleótidos cebadores (Rodríguez y Barrera 2004).

Acoplamiento: la mezcla es enfriada (55-72 $^{\circ}\text{C}$) para que los cebadores se acoplen o hibridicen a la secuencia complementaria en cada una de las cadenas de ADN (Rodríguez y Barrera 2004).

Elongación o extensión: una vez acoplados los cebadores, se incrementa la temperatura (generalmente 72 $^{\circ}\text{C}$) par que la Taq-polimerasa los extienda sobre la horma de ADN mediante la adición de las bases nitrogenadas libres (dNTPs), con el fin de sintetizar la nueva cadena amplificando las regiones de ADN de interés (Rodríguez y Barrera 2004).

Al final del proceso se obtiene dos moléculas idénticas de ADN. Estas tres fases constituyen un ciclo de PCR y el incremento en número de ciclos permite la

multiplicación exponencial de ADN original. El número de ciclos oscila entre 20 y 35 (Rodríguez y Barrera 2004).

2.4 ELECTROFORESIS

La técnica de PCR está asociada con la electroforesis en geles de agarosa; esta técnica permite visualizar el ADN amplificado durante la PCR e interpretar los resultados del diagnóstico de una determinada bacteria para cada muestra analizada.

La electroforesis es un proceso que permite la separación de fragmentos de ácidos nucleicos (ADN) por su tamaño, carga, peso molecular y configuración (circular y lineal), y se lleva a cabo a través de un soporte semisólido poroso denominado gel de agarosa.

La agarosa es un polisacárido extraído de una especie de alga roja. Es un polímero de repetición de unidades de un disacárido compuesto por β -galactopiranososa y 3,6 anhidro galactosa con enlaces 1-3 β -glucosídico. Los enlaces de hidrógeno entre cadena forman la red que da paso a la polimerización (Sambrook *et al.* 1989).

Los geles de agarosa pueden prepararse a diferentes concentraciones desde 0.3% hasta 2% según el tamaño de los fragmentos de ADN que se quieren separar, ya que la concentración de la agarosa determina el tamaño del poro de la gel. Se utiliza un tampón de carga que es un reactivo compuesto por un colorante, que permite visualizar la muestra dentro del gel, y glicerol o sucrosa que le da una alta densidad a la muestra permitiendo que el ADN permanezca en el fondo de las celdas del gel (Promega 2009).

Al momento de colocar los productos amplificados de PCR en el gel se debe considerar un orden:

La escalera molecular: es una mezcla de ADN de varios tamaños y peso molecular conocidos, que sirve para comparar la migración de sus bandas con la banda en la amplificación y determinar de esta manera el tamaño de esta última.

El control positivo: es el producto de una reacción de PCR que contiene el ADN amplificado en estudio. Al momento de realizar la electroforesis habrá migración de una banda en el gel a una altura determinada dependiendo del tamaño del segmento de ADN. Esta banda sirve de patrón de comparación para determinar si las demás muestras son positivas para el patógeno en estudio, ya que si en las demás muestras aparece una banda a la misma altura donde aparece en el control positivo significa que son positivas.

El control negativo: es el producto de una reacción de PCR que no contiene ADN amplificado del patógeno en estudio. Al momento de realizar la electroforesis no habrá migración de ADN, ni se observará una banda. Este control sirve para verificar que en el proceso de preparación de la reacción de PCR no se ha contaminado y la prueba está correctamente realizada.

Para poder visualizar el ADN en el gel de agarosa se utiliza una sustancia denominada bromuro de etilo la que tiene la propiedad de intercalarse entre las bases que componen la doble cadena de ADN. El complejo que forma en bromuro de etidio con el ADN al momento de ser expuesto a luz ultra violeta fluoresce, tomando un color anaranjado (Sambrook *et al.*, 1989).

2.5 RECOMENDACIONES PARA PCR

Los componentes físicos, químicos y térmicos involucrados en la PCR pueden ser modificados para optimizar el producto deseado. Las consideraciones generales para estos cambios son los siguientes:

Desnaturalización: si es incompleta por temperatura o tiempo insuficiente, permite el reacoplamiento de las cadenas y lo que lleva a la disminución del producto de amplificación. Por otro lado, pasos largos de desnaturalización producen pérdida en la actividad de la Taq-polimerasa (Rodríguez y Barrera 2004).

Acoplamiento: la temperatura en este paso es el factor más crítico para la optimización de la PCR. Si la temperatura es muy alta no hay apareamiento, y si es muy baja estos no son muy específicos. La temperatura y tiempo de apareamiento depende de la composición de las bases, y de la longitud y concentración de los cebadores.

Elongación: el tiempo de elongación depende de la longitud de la secuencia y de la temperatura.

Número de ciclos: cuando los otros parámetros están optimizados, el número de ciclos depende de la concentración de ADN. Un número muy alto puede incrementar la cantidad y complejidad de productos no específicos, y pocos ciclos pueden disminuir la cantidad de producto deseado.

Diseño de primers: uno de los parámetros más importantes para tener éxito en la amplificación por PCR es el diseño de los oligonucleótidos cebadores o primers. Si estos no están bien diseñados la PCR puede no funcionar bien; el resultado es nula amplificación del producto debido a la amplificación no específica. Se debe tener en cuenta las variables como: tamaño del oligonucleótido, temperatura de fusión, especificidad, secuencia complementarias, contenido en G/C y tramos de polipirimidinas (T, C) o polipurinas (A, G), secuencia 3' terminal, secuencia 5' terminal y regiones centrales. La secuencia del oligonucleótido debería elegirse de manera que no contenga zonas de poliG o poliC que puedan llevar a hibridación no específica (GEN 2009).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

El estudio se llevo acabó en el laboratorio de Microbiología de Alimentos y el laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

3.2 QUESOS ARTESANALES UTILIZADOS.

En este trabajo se analizaron tres marcas de queso semi seco de las marcas: Lácteos Bijagual (Q1), hecho por lácteos Montecristo Yoro, Honduras, C. A. Lácteos Boquerón (Q2), Olancho, Honduras. y quesos El Buen Sabor (Q3), Danlí, el Paraíso, Honduras. Elaborados con leche pura de vaca. Estos quesos fueron comprados en supermercados Paiz en Tegucigalpa, Honduras

3.3 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.

3.3.1 Enterococcosel Agar ®: es un medio selectivo para el aislamiento y recuento de Enterococcus, este medio se basa en la formulación de agar bilis esculina de Rochaix las peptonas proporcionan los nutrientes y los Enterococcus hidrolizan la esculina para formar esculina y glucosa. Se incluye el citrato férrico como indicador, que reacciona con la esculina para producir un complejo marrón a negro. Se utiliza bilis de buey para inhibir las bacterias gran positivas diferentes de los Enterococcus. La azida sódica inhibe los microorganismos gram negativos (Zimbro et al. 2003)

3.3.2 Universal Preenrichment Broth®: contiene peptonas como fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales sodios y fosfato de potasio para mantener las características del medio, el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico del medio, el magnesio, sulfato, amonio férrico y citrato proporcionan iones esenciales. Dextros es una fuente de energía, el piruvato de sodio ayuda a estimular el metabolismo de los organismos estresados. (Zimbro et al. 2003).

3.4 CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

Se extrajo 10 g de queso artesanal de cada marca, en bolsas estériles y se mezclaron en 90 ml de agua de dilución al 0.1% de peptona para evitar que la presión osmótica en el agua destilada fuerce el contenido celular hacia fuera destruyendo la células. Esta metodología se realizó con base en el protocolo del Bacteriological Analytical Manual (BAM) del FDA/CFSAN (Figura 1).

Para *Enterococcus spp.* y *Enterococcus faecium* se prepararon 750 ml del agar Enterocococel según el procedimiento sugerido por la casa comercial (Anexo1), para 30 platos petri, con 25 ml de agar; se dejó el medio de cultivo a una temperatura de 38 a 45 °C para mantenerlo líquido.

3.4.1 Método utilizado para la siembra y aislamiento de bacterias

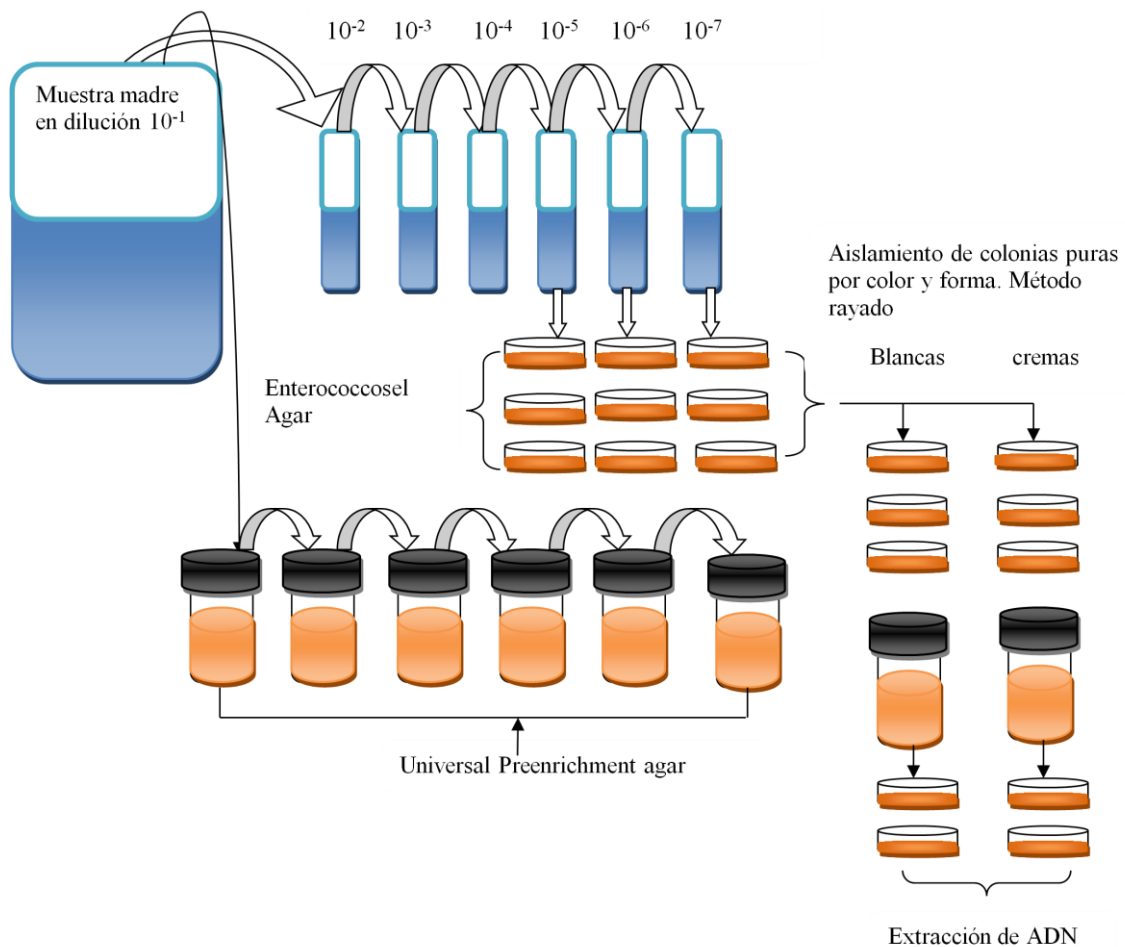


Figura 1. Método de aislamiento de cepas.

Se esterilizaron por 20 minutos a 120 °C y a 1.5 Kg/cm² los tubos de ensayo de 10 ml, pipetas de 1ml y de 10ml, probeta de 50 ml, agua peptonada y el Agar selectivo. Se realizó la siembra en un ambiente inocuo utilizando la cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones del ambiente. Se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ se sembró por medio de la técnica de regado (Figura 1), que consiste en colocar primero un ml de muestra en el plato petri y luego vaciar el agar a una temperatura de 39- 45 °C sobre la muestra y así creando un ambiente anaeróbico para la bacterias anaerobias y un ambiente aerobio para las bacterias aerobias, al momento de regar el agar en planto y mezclarlo.

De las diluciones menores de 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷. En platos petri de plástico estériles. Se sembraron tres platos petri por cada dilución (Figura 1) para cada queso se sembraron nueve platos petri para un total de 27 y se sembraron tres como controles para asegurar que no hubo contaminación al momento de siembra. Siguiendo las recomendaciones de la casa comercial del agar selectivo se incubaron a 35 °C por 48 horas.

3.5 AISLAMIENTO DE CEPAS.

El aislamiento de cepas se realizó por el método de rayado separando las cepas por características fenotípicas (color, forma y tamaño). Se aislaron seis cepas de cada queso con las mejores características para un total de 18 cepas, de estas cepas se repitió la técnica de rayado por seis veces para lograr pureza en las cepas. Luego se sembraron en caldo universal enriquecido (Universal Preenrichment) se preparo según el procedimiento sugerido por la casa comercial (anexo 2), por 48 horas para recuperar las paredes celulares que algunas bacterias pierden en el proceso de aislamiento.

Se aislaron las 18 cepas por medio de la técnica de rayado del medio enriquecido para ser sembradas en el medio selectivo (Agar Enterococcosel), de las 18 cepas se seleccionaron seis cepas, dos de cada queso las que presentaban mejores característica en crecimiento color y forma. Para poder tener un banco de estas cepas y extraer ADN se sembraron por rayado, dos platos por cepa.

3.6 EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN de las seis cepas se elaboró un buffer de lisis con proteinasa K y con el acido etilen-diaminotetracético (EDTA) (Anexo 5). En platos de PCR se colocaron 75ml de buffer de lisis y a los cuáles se les agregó un raspado de los platos seleccionados para la extracción. Las muestras fueron cubiertas con papel de aluminio y se introdujeron en el termociclador (Techne TC-512) y fueron sometidas a 65°C por 15 min para que la proteinasa K desnaturalice las proteínas y 10 min a 95°C para desnaturalizar el ADN e inactivar la Proteínasa K, después las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante 10 minutos para separar el ADN del resto de componentes de la célula, se colectó el sobrenadante y los ácidos nucleícos fueron precipitados con una solución 6:1 de etanol: acetato de amonio, luego se agregaron 300µl de una solución de ARNasa a 100 ng/ml, las muestras fueron llevadas a baño maría a

37°C por una hora para eliminar el ARN y dejar sólo ADN. Las muestras fueron retiradas y agitadas en un vortex y llevadas a microcentrifugación por 3 minutos a 3000 rpm para peletizar la ARNasa con los restos de ARN, el sobrenadante fue transferido a microtubos estériles de 1.5ml y se agregó 1ml de una solución 10:1 etanol: acetato de sodio para precipitar el ADN, este ADN fue centrifugado a 14000 rpm durante 5 min. Luego se agregaron 2ml de etanol al 70% para purificar el ADN. Las muestras de ADN se dejaron secar por 8 horas a temperatura ambiente se rehidrataron las moléculas de ADN con Buffer (TE) 0.1 X que mantiene el pH estable para evitar daños a la molécula de ADN.

3.7 CUANTIFICACIÓN DE ADN

Para la cuantificación y dilución del ADN se mezclaron 2 ml de buffer de cuantificación (10 µl solución para tinción concentrada + 100 ml de buffer TNE 1X; pH = 7.4) con 2 µl de muestra de ADN se empleo un Fluorómetro Hoefer DyNA Quant 200 ng/ml. Las mediciones se realizaron a 260 nm y las muestras se diluyeron a una concentración final de 30 ng/ml para los SCAR y 10 ng/ml para los RAPD.

3.8 CONDICIONES PARA LA REACCIÓN DE PCR

Para la reacción de PCR se emplearon los siguientes reactivos: primers Entero y FAC (cuadro 1) los cuales se llevaron a una concentración final de 1 µM y a un volumen final de 500 µl (anexo 3), buffer PCR 5X Green GoTaq® Flexi Buffer que contiene colorante azul de 3.5 kb y el colorante amarillo (<50pb), cloruro de magnesio (MgCl₂), dideoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), enzima GoTaq® ADN Polimerasa y ADN muestra. El volumen de referencia se usó fue del protocolo de 15 µl par a FAC y Entero, como referencia se usó el protocolo de SCAR usados en el laboratorio de fitomejoramiento y biotecnología aplicada. Los protocolos fueron elegidos de acuerdo a la cantidad de pares de bases para el primer Entero se tomó como un protocolo de referencia de 400 pares de bases, y como protocolo de referencia para el primer FAC se tomó uno de 1000 pares de bases (pb).

Cuadro 1. Descripción de primers utilizados en PCR

Secuencia de primer orientación 5´a 3´	Especificidad	Tamaño (pb)	Referencia
Entero1: 5´-CCCGGCTCAACCGGG-3´	<i>Enterococcus spp.</i>	404	Deasy et al. 2000
Entero2: 5´-CTCTAGAGTGGTCAA-3´			
FAC1: 5´-GAGTAAATCACTGAACGA-3´	<i>Enterococcus faecium</i>	941	Fortín 2008.
FAC2: 5´CGCTGATGGTATCGATTCAT-3´			

Para la diferenciación genética de las cepas se utilizaron 11 marcadores RAPD (cuadro 2), los cuales fueron usados a una concentración final de 10 μM y a un volumen final de 500 μl con el protocolo ya optimizado en el laboratorio (anexo 3).

Cuadro 2. Descripción de RAPD utilizados en la diferenciación de cepas

Nombre	Secuencia 5'-3'
OPA-14	TCTGTGCTGG
OPAC-20	ACGGAAGTGG
OPAK-20	TGATGGCGTC
OPC-01	TTCGAGCCAG
OPD-08	GTGTGCCCCA
OPF-13	GGCTGCAGAA
OPI-19	AATGCGGGAG
OPK-14	CCCGCTACAC
OPM-12	GGGACGTTGG
OPR-02	CACAGCTGCC
OPX-01	CTGGGCACGA
OPZ-10	CCGACAAACC

Fuente: Operon Technologies, Inc.

Cuadro 3. Protocolo de referencia para el marcador Entero. Tamaño de banda 400 bp

Reactivos	X1(μl)
dd H ₂ O	8.1
PCR Buffer	2.5
MgCl	0.0
dNTP's + MgCl ₂	1.2
Primer (F)	0.5
Primer (R)	0.5
Taq (Enzima)	0.2
ADN Template	2.0
Total	15.0

Fuente: Laboratorio de Fitomejoramiento y Biotecnología Aplicada, C.P.A. Zamorano.

En el perfil térmico se realizaron cambios en la temperatura de acoplamiento y se cambio el tiempo en desnaturalización inicial (cuadro 4).

Cuadro 4. Perfil térmico de referencia para el marcador Entero.

Perfil térmico	Temperatura (°C)	T° modifica da para el primer Entero 1	Tiempo (minutos)	Tiempo modificado para primer Entero1	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	94	3	1	
Desnaturalización	94	94	1	1	} 30
Acoplamiento	47	45	1	1	
Extensión	72	72	1	1	
Extensión final	72	72	5	5	} 1
Mantenimiento	15	15	∞	15	

Fuente: Laboratorio de Fitomejoramiento y Biotecnología Aplicada, C.P.A. Zamorano.

Para optimizar el protocolo para el marcador Entero se realizaron cinco pruebas con combinaciones en los reactivos como: dNTP's, primers, Taq (enzima) y ADN. Dando mejores resultado la prueba tres (P3), Cuadro 5.

Cuadro 5. Pruebas realizadas con el protocolo de referencia para el marcador Entero.

Reactivos	P1 µl	P2 µl	P3 µl	P4 µl	P5
dd H ₂ O	8.2	8.15	8.1	8.5	8.0
PCR Buffer	2.5	2.5	2.5	2.05	2.5
MgCl	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
dNTP's + MgCl ₂	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Primer (F) Entero1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Primer (R) Entero1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Taq (Enzima)	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
ADN Template	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Total	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0

Cuadro 6. Protocolo de referencia para el marcador FAC. Tamaño de banda de 1000 pb

Reactivos	1X (μ l)
dd H ₂ O	8.2
PCR Buffer	2.5
MgCl	0.0
dNTP's + MgCl ₂	1.2
Primer (F) FAC F	0.5
Primer (R) FAC R	0.5
Taq (Enzima)	0.1
ADN Template	2.0
Total	15.0

Fuente: Laboratorio de Fitomejoramiento y Biotecnología Aplicada, C.P.A. Zamorano

Para optimizar el protocolo el marcador FAC se realizo cinco pruebas con combinaciones en los reactivos como: dNTP's, primers, Taq (enzima) y ADN. Dando mejores resultado la prueba uno (P1), Cuadro 7.

Cuadro 7. Pruebas realizadas con el protocolo de referencia para el marcador FAC.

Reactivos	P1	P2	P3	P4	P5
dd H ₂ O	8.2	8.15	8.1	8.5	8
PCR Buffer	2.5	2.5	2.5	2.05	2.5
MgCl	0	0	0	0	0
dNTP's + MgCl ₂	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Primer (F) Entero1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Primer (R) Entero1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Taq (Enzima)	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
ADN Template	2	2	2	2	2
Total	15	15	15	15	15

Fuente: Laboratorio de Fitomejoramiento y Biotecnología Aplicada, C.P.A. Zamorano.

En el perfil térmico (Cuadro 8) se realizo cambio en la temperatura de acoplamiento en el tiempo de extensión y en el tiempo de almacenamiento

Cuadro 8. Perfil térmico de referencia para el marcador FAC.

Perfil térmico	Temperatura (°C)	T° modificada para el primer FAC	Tiempo (minutos)	Tiempo modificado para primer FAC	Ciclos
Desnaturalización inicial		94		2	
Desnaturalización	94	94	1	1	} 30
Acoplamiento	58	50	1	1	
Extensión	72	72	2	1	} 1
Extensión final	72	72	5	5	
Mantenimiento	15	15	∞	15	

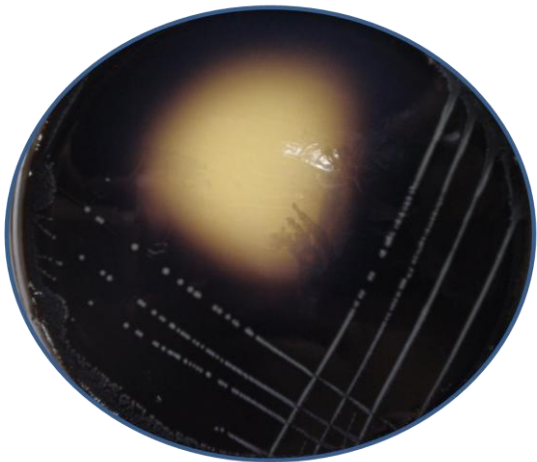
Fuente: Laboratorio de Fitomejoramiento y Biotecnología Aplicada, C.P.A. Zamorano.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS.

Se aislaron seis cepas con diferencias fenotípicas entre ellas utilizando la técnica de rayado (Figura 2), y se comprobó con la prueba de tinción Gram, que son Gram positivas y son capaces de crecer en medios anaerobios y aerobios siendo aerofacultativas.

Colonias de
color blanco



Colonias de
color crema

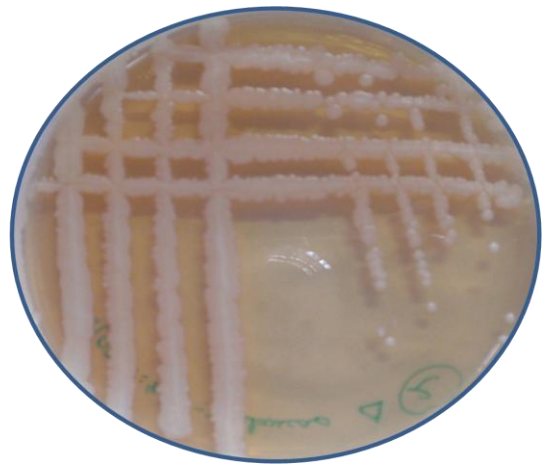


Figura 2. Bacterias blancas y bacterias cremas aisladas de quesos artesanales.

Se aislaron seis cepas de las siembras originales por medio de vertido, dos de cada queso muestreado, con diferencias fenotípicas en color y tamaño (Figura 2). Las bacterias de color blanco son las que hidrolizan la esculina para producir esculetina la cual reacciona con citrato férrico para producir el color marrón o negro que identifica al género *Enterococcus spp.* (Zimbardo y Power 2003), y las cepas de color crema son cocos, gram positivas y aerofacultativas pero no tiñen el agar selectivo para *Enterococcus*.

4.2 EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS CEPAS.

Las muestras mostraron variaciones en la concentración de ADN (Cuadro 9), para estandarizar las muestras se realizó una dilución a 30ng/ml para los SCAR y 10ng/ml para los RAPD y que las muestras sean sometidas bajo las mismas condiciones.

Cuadro 9. Concentración inicial de ADN de las 6 cepas aisladas

Muestra	Ci= ng/ml Vi ₁ M1	Cf ₁ =30 ng/ml Vi ₂ M1
Blancas Q1	11	11.00
Blancas Q2	292	3.91
Blancas Q3	18	15.71
Cremas Q1	12	12.00
Cremas Q2	31	16.50
Cremas Q3	15	27.50

4.3 OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS PARA LOS PRIMERS ENTERO Y FAC

Una vez realizadas las modificaciones en el protocolo base, se observaron las amplificaciones en electroforesis y se estableció el protocolo 3 (Cuadro 10) como el más adecuado y cuya temperatura de acoplamiento fue a 47°C. En el cuadro 10 se detalla la optimización del primer Entero para la identificación de *Enterococcus spp.* con presencia de bandas de ADN claras presentes en las cepas de color blanco, y el cuadro 11 se detalla la selección del perfil térmico para el Primer Entero.

Cuadro 10. Protocolo optimizado para el marcador Entero

Reactivos	P3 (μl)
dd H ₂ O	8.1
PCR Buffer	2.5
MgCl	0.0
dNTP's + MgCl ₂	1.2
Primer (F) Entero F	0.5
Primer (R) Entero R	0.5
Taq (Enzima)	0.2
ADN Template	2.0
Total	15.0

Cuadro 11. Perfil térmico seleccionado para el marcador Entero

Perfil térmico	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	1	
Desnaturalización	94	1	} 30
Acoplamiento	47	1	
Extensión	72	1	} 1
Extensión final	72	5	
Mantenimiento	15	∞	

En el cuadro 12 se detalla la optimización del protocolo para la identificación de *Enterococcus faecium* con el primer FAC y el cuadro 13 presenta el perfil térmico seleccionado para el primer FAC en donde la temperatura de acoplamiento fue a 50°C.

Cuadro 12. Protocolo optimizado para el marcador FAC

Reactivos	P1 (μl)
dd H ₂ O	8.2
PCR Buffer	2.5
MgCl	0.0
dNTP's + MgCl ₂	1.2
Primer (F) FAC F	0.5
Primer (R) FAC R	0.5
Taq (Enzima)	0.1
ADN Template	2.0
Total	15.0

Cuadro 13. Perfil térmico seleccionado para el marcador FAC

Perfil térmico	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	2	
Desnaturalización	94	1	} 30
Acoplamiento	50	1	
Extensión	72	1	} 1
Extensión final	72	5	
Mantenimiento	15	∞	

4.4 RESULTADO DE LA PCR PARA LOS MARCADORES ENTERO Y FAC

En la figura 3 se detalla el resultado de la PCR donde se identificó como *Enterococcus spp.* a las cepas blancas de Q1, Q2 y Q3 (Q=queso) en las celdas 5, 6 y 7 por presentar una banda de 404 pb y las cepas de color crema de Q1, Q2 y Q3 no se identificaron como *Enterococcus spp.* Las cepas que se identificaron como *Enterococcus spp.* fueron amplificadas con los primers FAC y se identificaron como *Enterococcus faecium* presentando una banda clara a 941 pb.

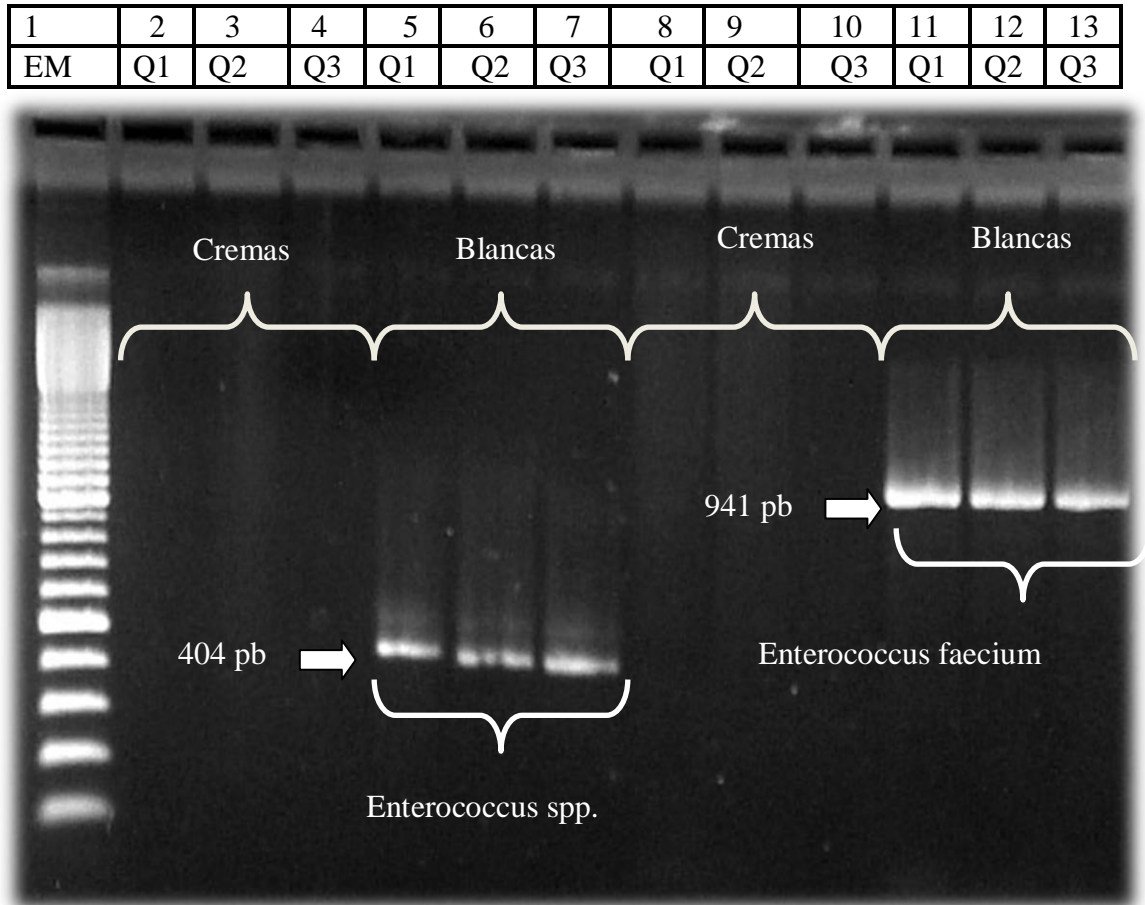


Figura 3. Gel de los marcadores Entero y FAC. 1: escalera molecular, 2: cepa crema queso 1, 3: cepa crema queso 2, 4: cepa crema queso 3, 5: cepa blanca queso 1, cepa blanca queso 2, 7: cepas blanca queso 3, 8: cepa crema queso 1, 9: cepa crema queso 2, 10: cepa crema queso 3, 11: cepa blanca queso 1, 12 cepa blanca queso 2, 13: cepa blanca queso 3.

4.5 ANALISIS CON MARCADORES RAPD PARA LA DIFERENCIACIÓN DE CEPAS.

En la figura 4 se observan las diferencias entre cepas lo que indican los marcadores RAPD que selecciona al azar ADN, como es el ejemplo del marcador OPAC-20 que muestra polimorfismos que permiten establecer diferencias entre cada cepa de cada queso, lo que significa que las 3 cepas de *Enterococcus faecium* tienen diferencias genotípicas entre ellas. Con estos resultados se realizó una matriz tipo 1 (83 filas \times 6 columnas), la cual fue analizada con el programa NTSYSpc 2.1 y se construyó un dendrograma.

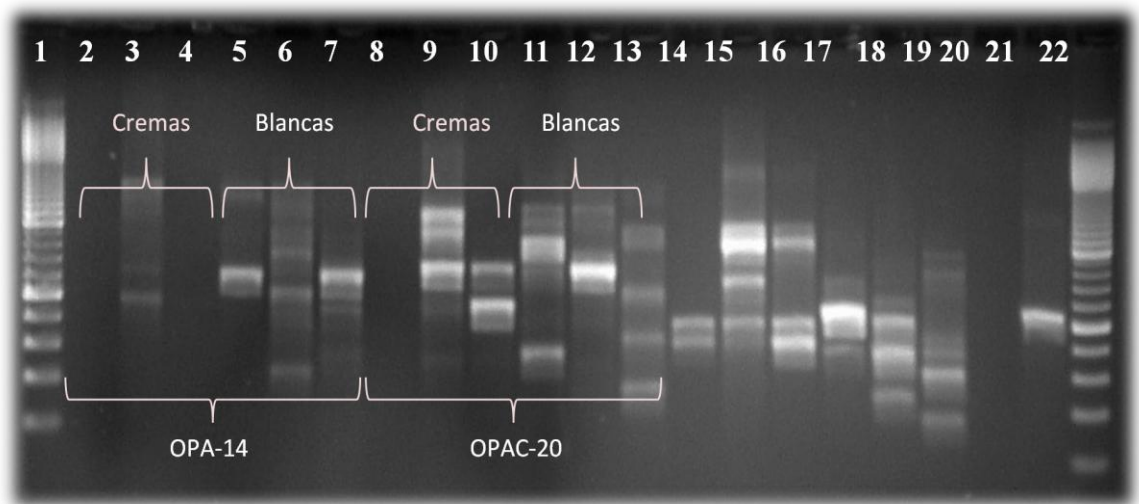


Figura 4. Diferenciación de cepas con marcadores RAPD.

La figura 5 muestra los resultados del análisis con 11 marcadores RAPD que permitieron identificar 83 polimorfismos de ADN; las distancias genéticas fueron estimadas usando el coeficiente de Dice y se generó un dendrograma mediante un análisis UPGMA, el cual mostró diferencias genotípicas entre las cepas identificadas.

Dando a conocer que las cepas de *Enterococcus faecium* del queso 2 y queso 1 tienen más similitud que las cepas del queso 3 al igual que las cepas de color crema tienen similitud en las cepas de queso 1 y queso 2 y también se define que todas las cepas son diferentes entre sí.

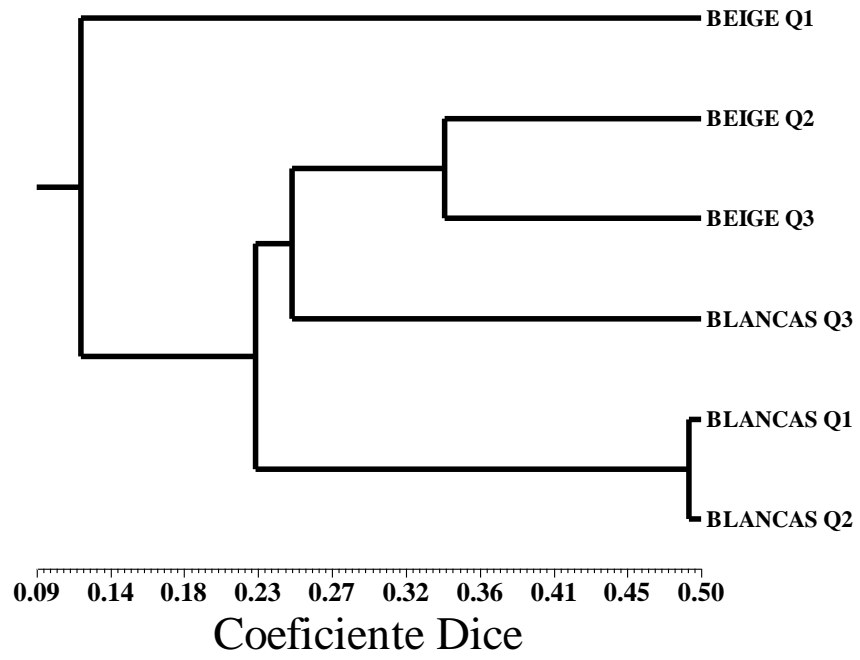


Figura 5. Dendrograma realizado de los resultados del análisis de los 11 marcadores RAPD.

5 CONCLUSIONES

- Se aislaron seis cepas de bacterias con características fenotípicas similares.
- Se establecieron protocolos para la identificación del genero *Enterococcus ssp.* y para la especie *Enterococcus faecium*.
- Se comprobó la presencia de *Enterococcus ssp* en los quesos artesanales.
- El análisis con los marcadores RAPD muestran diferencias genotípicas entre las cepas aisladas.
- Las cepas de color crema no identificadas por PCR son: cocos, gram positivas y son anaerobias facultativas.

6 RECOMENDACIONES

- Hacer quesos industriales con cultivo láctico de *Enterococcus faecium*, y evaluar el aporte en las características sensoriales de los quesos.
- Aplicar los protocolos establecidos en la identificación de *Enterococcus spp.* y *Enterococcus faecium* en productos lácteos.
- Identificar otros géneros y especies de microorganismos presentes en derivados de la leche y en productos cárnicos.

7 LITERATURA CITADA

Chang, Y., Jung, P., Lee, N. y Paik, H. Characterization and Enhanced Production of Enterocin HJ35 by *Enterococcus faecium* HJ35 Isolated From Human Skin. (En línea). Consultado el 12 de octubre de 2009. Disponible en: <http://www.aginternetwork.net/whalecomwww.aginternetwork.org/whalecom0/en/journals/>

Fortina, M., Ricci, G., Borgo, F. y Manachini, P. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* spp. nov. (En línea). Milan, Italia. Consultado el 13 de octubre de 2009. Disponible en: <http://www.aginternetwork.net/whalecomijs.sgmjournals.org/whalecom0/cgi/content/abstract/54/5/1717>

Fortin, A. 2008. Estudio polifásico de la diversidad microbiana de quesos artesanales elaborados con leche cruda de cabra. Granada, España. 317p.

Franz, C., Stiles, M., Schleifer, K. y Holzapfel, W. 2003. *Enterococci* in foods a functional and safety aspects. (En línea). Consultado el 6 de septiembre de 2009. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T7K-48Y6SBX-5/2/61d3de77510237415bc190c29f0121c4>

GEM. PREMIER Biosoft International (en línea) consultado el 14 de octubre de 2009. Disponible en: <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>

Guachambala, M. 2007. Identificación de biotipos A, B y Q de *Bemisia tabaci* y la especie *Trialeurodes vaporariorum*, en zonas de producción hortícola de Honduras. Valle de Yeguaré, Tegucigalpa, Francisco Morazán, Honduras. 34p.

Prescott L., Harley, J. y Klein, D. 2002. Microbiología. Traducido por C de la Rasilla y Í Uzcudum. Quinta edición. Madrid, Buenos Aires. Editora Mc Graw Hill. 1240p.

Sambrook, J. Fritsch, D. Maniatis, T. 2002. Molecular Cloning: A laboratory manual. Tomo Uno. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Press, New York.

Mullis, K. 1982. "The unusual origin of the polymerase chain reaction". Scientific American 262(4): 21-28p.

Renye, J., Somkuti, G., Paul, M. y Van, D. Characterization of antilisterial bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolates from Hispanic-style

cheeses.(On line). United States. Consultado el 12 de octubre de 2009. Disponible en: <http://www.aginternetnetwork.net/whalecomwww.springerlink.com/whalecom0/content/x438036nq54w7k84/>.

Rodríguez, I. y Barrera, H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 6p.

Stansfield, W. c1992. Genética. Trad. por P Ramos. 3ed. México, Distrito Federal, Editora Latinoamericana. 574 p.

Watson, J. y Crick, F. 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. Cambridgeshire, Londres, Inglaterra. Vol: 171. 4p.

Zimbro, M., y Power, D. 2003. Difco™ & BBL™ Manual. United States of America. Editora Becton, Dickinson and Company. 706p.

8 ANEXOS

Anexo 1. Indicaciones para Agar Enterococcosel. .

Se mezcla 56 g de Agar Enterococcosel para un litro de agua destilada se calienta y se agita por un minuto, luego se pone a esterilizar en el autoclave a 121 °C por 15 minutos. (Zimbardo, M., y Power, D. 2003)

Anexo 2. Indicaciones para Universal Preenrichment Broth.

Se mezclan 38 g de Universal Preenrichment Broth en un litro de agua destilada, se mantiene en agitación por un minuto luego esteriliza a 121 °C por 15 minutos. (Difco, 2003)

Anexo 3. Rehidratación de primers

- Encontrar la concentración inicial de los primers en μM :
 - Multiplicar OD por el valor de nanomol por OD, estos valores son característicos de cada primer. El valor resultante es la cantidad de nanomoles en el pellet del primer.
 - El resultado se divide para el valor del μg 's (μl de agua). Se obtiene nanomoles por μl .
 - Se convierte a pimoles $\mu\text{l} = \mu\text{M}$
- Se reemplaza en la ecuación $C_i V_i = C_f V_f$ para conocer el volumen inicial del primer rehidratado que se va depositar en 5000 μl de agua destilada y desionizada. La concentración final es de 1 μM .

Anexo 4: Protocolo de extracción de ADN con proteinasa K.

1. moler fragmentos de hoja de aproximadamente 1 cm^2 (provenientes de material fresco y liofilizado), con un pistilo delgado en un tubo Eppendorf y adicionar 100 μl del amortiguador de extracción.
2. Incubar la suspensión a 50 °C por una hora y diluir con 150 μl de agua bidestilada (el extracto puede congelarse a -80 °C en este estado)
3. Incubar 20 μl del extracto con 80 μl de ARNasa A (125 $\mu\text{l}/\text{ml}$ en agua bidestilada y hervir en baño de agua por 5 minutos.

4. Enfriar a temperatura ambiente, remover 10 μ l y diluir con 240 μ l de agua bidestilada.
5. Remover 5 μ l de este extracto y usarlo directamente para la PCR.

Anexo 5: Reactivos usados para la extracción de ADN de las cepas.

Concentración inicial	Concentración final	Volumen de 1 ml
0.5MEDTA-8.0	0.5 mM	1 μ l
1M Tris-HCl pH=8.0	5 mM	5 μ l
Nonident P-40	0.50%	5 μ l
Proteinasa K	1.0 mg/ml	0.001g
dH ₂ O		989.0 μ l
Total		1000 μ l

Fuente: Guachambala, 2007