

**Clasificación de *Lactobacillus* spp.
provenientes de queso fresco artesanal
utilizando Reacción en Cadena de la
Polimerasa (PCR) y EcoR I**

**Leonel Armando Sorto Cruz
Andrés Sotelo Villegas**

Honduras
Diciembre, 2006

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

**Clasificación de *Lactobacillus* spp.
provenientes de queso fresco artesanal
utilizando Reacción en Cadena de la
Polimerasa (PCR) y EcoR I**

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

Presentado por:

**Leonel Armando Sorto Cruz
Andrés Sotelo Villegas**

Honduras
Diciembre, 2006

Los autores conceden a Zamorano
permiso para reproducir y distribuir copias
de este trabajo para fines educativos. Para otras
personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Leonel Armando Sorto Cruz

Andrés Sotelo Villegas

Honduras
Diciembre, 2006

Clasificación de *Lactobacillus* spp. provenientes de queso fresco artesanal utilizando Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y EcoR I

Presentado por:

Leonel Armando Sorto Cruz
Andrés Sotelo Villegas

Aprobada:

Luís Fernando Osorio, Ph.D.
Asesor Principal

Raúl Espinal, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria

Wilfredo Domínguez, M.Sc.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

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

DEDICATORIA
L. A. S. C.

A Dios, que en su amor y justicia me ha sostenido.

A mis padres, a quienes admiro y amo.

Mis hermanas, quienes siempre han tenido una palabra de aliento.

Mis amigos, que me han brindado su sincera amistad y apoyo incondicional.

DEDICATORIA
A. S. V.

A Dios, gran líder y guía.

A mis padres y hermanos, por su apoyo y confianza incondicional.

A mis maestros, quienes trabajaron a nuestro lado a lo largo de nuestra formación educativa.

A Zamorano, institución que apreciamos y valoramos por enriquecer nuestra formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

L. A. S. C.

A Dios, mi Padre celestial que me ha guiado y mostrado sus enseñanzas en cada etapa de mi vida.

A mis padres Armando y Elba Marina por su apoyo, cariño incondicional además de sus enseñanzas de vida que siempre llevo conmigo.

A mis hermanas Enith e Ingrid por hacerme ver mis errores y brindarme su cariño.

A mis amigos, que siempre me brindan sus mejores y sinceros deseos a través de las oraciones.

A Andrés Andrade y su familia, que me han brindado de su sincera amistad y ser bendición para mi vida.

A las wifes que hicieron de Zamorano un mejor lugar para vivir.

Al grupo cristiano Rompiendo Fronteras, porque me apoyaron siempre en oración, en especial Siria y Cristiana.

A mis asesores, Dr. Luis Fernando Osorio e Ing. Wilfredo Domínguez, por la oportunidad de realizar este proyecto.

A Luz M^a y Tomasita que nos brindaron su apoyo en el laboratorio del PIF.

AGRADECIMIENTOS

A. S. V.

A Dios, por las bendiciones que recibo de él, por enseñarme a luchar, disfrutar y aprender en todo momento.

A mis padres, Miriam Villegas y Ramiro Sotelo, por su ejemplo, dedicación y la mejor herencia que pueden ofrecerme: su amor y educación.

A mis hermanos: Francisco Sotelo y Tamara Sotelo por su apoyo.

A amigos, especialmente a todos aquellos que lograron que este tiempo sea agradable.

A mis asesores, Dr. Luis Fernando Osorio e Ing. Wilfredo Domínguez, con quienes inicié este proyecto, por su apoyo, amistad y por fortalecer mis conocimientos y metodología de trabajo.

RESUMEN

Sotelo, A. y Sorto, L., 2006. Clasificación de *Lactobacillus* spp. provenientes de queso fresco artesanal utilizando Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y EcoR I. Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria, El Zamorano, Honduras. 38 p.

En la actualidad la industria artesanal láctea está evolucionando hacia un comercio internacional en el cual las normativas de higiene y calidad son más exigentes; por lo que se pretende que estas empresas estandaricen sus procesos para brindar productos de alta calidad, libres de patógenos y con características sensoriales propias de estos productos. El objetivo de este estudio fue clasificar cepas de *Lactobacillus* spp. presentes en queso artesanal utilizando Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y EcoR I. Se aislaron 39 colonias de *Lactobacillus* spp. y se clasificaron 24, posibles responsables de brindarle características sensoriales al queso artesanal elaborado en la empresa Lácteos Ledezma ubicada en Tocoa, Honduras. Para la realización del estudio se tomó una muestra de queso artesanal en proceso, del cual se aislaron distintas colonias de *Lactobacillus* spp. utilizando dos medios de cultivo específico: MOX con 30µg/ml de Vancomicina y MRS con 30µg/ml de Vancomicina. La clasificación de las colonias de *Lactobacillus* spp. aisladas se realizó por medio de la amplificación del ADN, aplicando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para tal efecto se utilizaron dos cebadores de 25 pares de bases universales dirigidos al ADN del 16S ribosomal. El producto de PCR fue sometido al proceso de electroforesis en un gel de agarosa al 1% y en un gel de agarosa al 2%, esta última brindó mejores resultados al momento de visualizar las muestras. Adicionalmente se comparó el producto del PCR sometido a un proceso de digestión con la enzima de restricción EcoR I. Se diferenciaron 9 cepas de *Lactobacillus* spp. con la comparación de ambos geles.

Palabras clave: 16s, cebador, electroforesis, enzima de restricción, Vancomicina.

CONTENIDO

Portadilla	i
Autoría.....	ii
Página de firmas	iii
Dedicatoria L. A. S. C.	iv
Dedicatoria A. S. V.	v
Agradecimientos L. A. S. C.	vi
Agradecimientos A. S. V.....	vii
Resumen	viii
Contenido	ix
Índice de cuadros.....	xi
Índice de figuras.....	xii
Índice de anexos.....	xiii
1. REVISIÓN LITERARIA.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Lactobacillus spp.	2
1.3. Vancomicina.....	2
1.4. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y Enzima EcoR I	2
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1. Muestra.....	5
3.2. Aislado de cepas.	5
3.3. Crecimiento de bacterias.	5
3.4. Extracción de ADN	5
3.5. Cuantificación de ADN	6
3.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	6
3.7. Enzimas de restricción.....	6
3.8. Electroforesis.....	6
3.9. Visualización	7
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4.1. Aislado de cepas.....	8
4.2. Extracción de ADN	9
4.3. PCR, digestión con EcoR I y electroforesis	9
4.4. Comparación entre los productos de PCR puros y los productos de PCR digeridos con EcoR I:	13

5.	CONCLUSIONES	15
6.	RECOMENDACIONES	16
7.	BIBLIOGRAFÍA	17
8.	ANEXOS	19
9.	TERMINOLOGÍA	22
9.1.	PCR (Polimerase Chain Reaction)	23
9.2.	Reactivos de PCR (Polimerase Chain Reaction)	23
9.2.1.	dNTP's (Dideoxinucle+olidos Trifosfatos)	23
9.2.2.	Cebadores (Pirmers)	23
9.2.3.	Enzima Taq Polimerasa	23
9.2.4.	Buffer	23
9.2.5.	ADN plantilla	24
9.3.	Fases PCR	24
9.3.1.	Separación de las cadenas de ADN	24
9.3.2.	Fase de hibridación	24
9.3.3.	Fase de síntesis	24
9.4.	Electroforesis	24

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1. Cuantificación de 28 muestras de ADN (ng/ml) *Lactobacillus* spp. aisladas de queso fresco artesanal. 9

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Comparación de cultivo de bacterias en medio MOX con 30 µg/ml de Vancomicina (izquierda) y MRS con 30 µg/ml de Vancomicina (derecha) ...	8
2.	Visualización de PCR empleando ADN extraído de 21 cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. aisladas de queso fresco artesanal en gel de agarosa al 2%.....	10
3.	Visualización de PCR empleando ADN extraído de 21 cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. aisladas de queso fresco artesanal en gel de agarosa al 2%.....	11
4.	Visualización de producto de PCR empleando ADN extraído de 21 cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. aisladas de queso fresco artesanal, digerido con EcoR I, en gel de garosa al 2%.....	12
5.	Visualización de producto de PCR empleando ADN extraído de 3 cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. aisladas de queso fresco artesanal, digerido con EcoR I, en gel de agarosa al 2%.	13

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Carga microbiológica encontrada en las muestras de queso artesanal analizadas en Lima, Perú. (Cristóbal y Maurtua, 2003).....	20
2.	Escalera utilizada como parámetro de amplificación. Promega 100bp DNA Ladder.....	21

1. REVISIÓN LITERARIA

1.1. ANTECEDENTES

El estudio realizado por Cristóbal y Maurtua en el 2003, nos demuestra que en la producción de quesos artesanales existen diversas colonias: *Lactobacillus* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, coliformes fecales y otras bacterias aerobias mesófilas. Todas estas bacterias crecen entre 18 y 22 °C, con una humedad entre 69 y 82 % y pH entre 4.9 y 6.5. Los quesos artesanales que se analizaron en este estudio reportaron conteos de coliformes fecales de $8.3 > 10^2$ número más probable por gramo (MPN/g), indicando un mal manejo de toda la cadena productiva, desde materia prima hasta la comercialización. Los conteos finales como resultado de este estudio se presentan en el anexo 1.

La doctora Olga Vasek (2003), ha participado en diversos estudios en torno a las colonias de microorganismos presentes en el queso artesanal de Argentina. En uno de sus estudios analizó el efecto en el proceso de maduración de quesos artesanal de determinadas cepas “salvajes” de *Lactobacillus* y *Lactococcus* que habían sido aisladas, el resultado final del estudio demostró que la inoculación de algunas de estas cepas brindaban al producto final las características sensoriales propias del queso artesanal.

El doctor Ángel Fusco (2005) en una entrevista realizada por la revista El Universitario, expresa la importancia de un estudio que está desarrollando para el rubro tradicional de quesos titulado: “Fermento autóctono para la elaboración del queso artesanal de Corrientes”. El objetivo final de este estudio es identificar las cepas de organismos que le propician las cualidades propias del queso artesanal de Corrientes; de esta forma brindarles a los artesanos la oportunidad de elaborar un queso con las mismas características sensoriales, que cumpla con las normas fitosanitarias exigidas para su exportación a países europeos y aprovechar su denominación de origen.

En el estudio realizado por Tharmajar y Shah en el 2003, se hizo una comparación entre distintos medios selectivos para *Lactobacillus*. Los medios fueron todos a partir de MRS: MRS-Vancomicina, MRS agar, pH modificado, MRS sal modificado, MRS-bilis y MRS cloruro de litio agar. También se comparó MRS puro con BA-sorbitol, BA-manitol, BA-maltosa y BA-esculina. Los tiempos de incubación variaron entre 24 y 72 horas con distintos resultados de acuerdo al tratamiento. El más efectivo y con mayor desempeño fue el MRS-Vancomicina.

Según Valerie Coueret (2003), la temperatura y tiempo óptimo para incubar *Lactobacillus* spp. en medio MRS es de 37°C con un máximo de 72 horas. En el estudio que se llevó a cabo por Tharmaraj. y colaboradores (2003) se utilizó un caldo de MRS durante 12 horas para el crecimiento de las colonias de *Lactobacillus*. En este estudio también se observó que algunas especies de *Lactobaillus* spp. inhiben el crecimiento de otras bacterias como *Stafilococcus aureus* y *Listeria monocitogenes*, por lo tanto estas bacterias propician la reducción de antibióticos en los medios.

1.2. LACTOBACILLUS SPP.

Pertenciente al grupo de bacterias ácido lácticas, estas se encuentra en el tracto intestinal de los humanos, caracterizada por ser una bacteria Gram positivo y anaerobia facultativa. La mayoría de sus subespecies reducen los azúcares a ácido láctico y son organismos homo fermentativo; es utilizada en la agroindustria para la fermentación de distintos alimentos como yogur, suaerkraut, pepinillos y otros.

Por su habilidad de acidificar los alimentos, restringe el crecimiento otras bacterias; los *Lactobacillus* reducen la incidencia de diarreas y de intoxicaciones (Erdourul y Erbülür, 2005). Además, tienen resistencia a peróxido de hidrógeno y concentraciones medias de cloruro de sodio (7.5%).

1.3. VANCOMICINA

El modo de acción de este antibiótico cosiste en obstruir los precursores de la formación de la pared celular exclusivamente en bacterias Gram positivo, evitando la incorporación de las sub unidades del ácido N-acetilmuramico y N-acetilglucosamina-péptido a la matriz del péptido glicano, que conforma la mayor parte estructural de la pared celular de las bacterias Gram positivas.

1.4. PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA) Y ENZIMA EcoR I

Durante un estudio realizado en Suecia, en la identificación de distintas especies de *Lactobacillus* se utilizó esta técnica combinada con un Gradiente Temporal de Temperatura en Electroforesis (TTGE por sus siglas en inglés). En este estudio se utilizó el cebador 16S aplicando el protocolo de Johansson. Además, se hizo un análisis de restricción de endocrinaza RAE con EcoR I, Hind III y Cla I durante 4 horas a 37°C y finalmente se hizo un demograma de las distintas cepas. Con este estudio se demostró que los *Lactobacillus* tienen como ancestro común al *Lactobacillus zaeae* (Vásquez y colaboradores, 2005).

En el estudio de Tharmajar y Shah (2003) antes nombrado, se utilizaron distintos marcadores moleculares para identificar colonias de *Lactobacillus*, entre los que se

mencionan: 16S y el 23S. También utilizaron enzimas de restricción como la EcoR I, Sma I, arv II, apa I y otras.

En otro estudio realizado por Meroth y colaboradores (2003) se analizaron cepas de *Lactobacillus* utilizando el cebador 16S, se obtuvieron bandas de 189 pares de bases y se comparó este cebador con el 28S con el cual se obtuvieron bandas de 799 pares de bases. Con estos cebadores lograron diferenciar las especies *L. paracasei*, *L. paralimentarius*, *L. kimchii*, y *Lactobacillus perolens*. Para lograr reconocer estas cepas utilizaron posteriormente al PCR secuenciaron el ADN amplificado y compararon los resultados con una base de datos genética llamada BLAST algorithm y el programa ARB.

2. INTRODUCCIÓN

La industria láctea hondureña actualmente se enfrenta al reto de ser mas competitiva, pues las nuevas tendencias del mercado exigen productos saludables, libres de microorganismos patógenos y con cualidades sensoriales atractivas para los consumidores; consientes de esta tendencia actualmente la Secretaria de Agricultura y Ganadería de Honduras está en proceso de establecer una normativa que regule los sistemas de procesamiento de leche y derivados. Dentro de las regulaciones que se pretenden implementar para tal efecto está la utilización de leche pasteurizada para la elaboración de quesos, por lo que la industria artesanal (600 industrias identificadas) podría verse afectada (FAO, 2003).

Los productos artesanales por su tradición y el compendio de características sensoriales que poseen, gozan de una alta aceptación entre la población Hondureña y países de la región a los que exportan algunos de sus productos. El queso fresco artesanal se elabora a partir de leche cruda por lo general de vacas criollas, con fermentación espontánea y corta maduración usando metodologías muy rudimentarias, no estandarizadas.

El queso fresco artesanal, dentro de la gama de productos lácteos elaborados, es el que cuenta con mayor número de microorganismos patógenos al momento de ser comercializado. Por esta razón se le asocia con mayor frecuencia con brotes de intoxicaciones alimentarias (Padilla y colaboradores, 1996).

La capacidad de identificar los diferentes cultivos acidificantes utilizados para hacer quesos representa un avance significativo para la industria artesanal hondureña pues esto permitirá elaborar estos productos de manera industrial manteniendo las características sensoriales deseadas por el mercado y altos estándares de calidad. Dentro de las bacterias que se cree tienen influencia en las características sensoriales del queso artesanal son *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, de estos microorganismos se ha encontrado que las especies de *Lactobacillus* son las que se encuentra en mayor proporción (Cristóbal y Maurtua, 2003).

El objetivo de este estudio fue clasificar cepas de *Lactobacillus* spp. presentes en queso artesanal utilizando Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y EcoR I. Además, aislar cepas de *Lactobacillus* spp. presentes en el queso artesanal elaborado en la empresa Lácteos Ledezma ubicada en Tocoa, Honduras; realizar la extracción, amplifica, digerir y visualizar el ADN ribosomal 16S.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTRA

Se adquirieron aproximadamente 200 gramos de muestra de queso artesanal en proceso proveniente de la empresa Lácteos Ledezma del Ing. Luís Ledezma ubicada en Tocoa, Honduras. La muestra fue transportada al laboratorio de microbiología de Zamorano a 4°C, para su respectivo estudio.

Se homogenizaron 10 gramos de muestra de queso artesanal en proceso con 50 ml de leche esterilizada (15 min a 121°C), en dos bolsas estériles (Whirl Pak). Se extrajo 1 ml de esta solución y depositaron en tubos Eppendorf® (2 ml) con 1 ml de glicerol (Equilab S.A. Comayagüela, Honduras) y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido a -192°C. Con este procedimiento se creó la base genética madre.

3.2. AISLADO DE CEPAS.

Las muestras fueron cultivadas en dos medios para aislar *Lactobacillus* spp. MOX (Modified Oxford Agar) con 12 µg/ml de Vancomicina (Alpharma Tanska, Dinamarca) y MRS (Man, Rogosa and Sharpe) con 30 µg/ml de Vancomicina obtenido del estudio hecho en Université de Caen Basse-Normandie (Coeuret y colaboradores., 2003), se utilizó la técnica de Pour plate y los platos fueron incubados a 37°C por 48 hr.

3.3. CRECIMIENTO DE BACTERIAS.

Se seleccionaron 39 de las colonias aisladas con mejores cualidades visuales en relación a tamaño y buenas condiciones de aislamiento. Estas fueron rayadas individualmente en un plato petri desechable con aproximadamente 20 ml de medio MRS e incubadas (Fisher Scientific isotemp incubator USA) a 37°C por 48 hr para propiciar su reproducción. Estas muestras fueron recolectadas en tubos de ensayo y resuspendidas en 2 ml de agua peptonada (1%). De esta forma se obtuvo la segunda base genética.

3.4. EXTRACCIÓN DE ADN

De la segunda base genética se reprodujeron las bacterias realizando un rayado de la misma forma en que se explicó anteriormente. Las muestras de bacterias fueron recolectadas y resuspendidas en 100 µl de agua peptonada (1%) en un tubo eppendorf (2

ml). Se obtuvo un pellet producto de la centrifugación de las muestras a 15,000 x g por 5 min (BHE Hermle Z 230 M Chicago USA). El sobrenadante fue retirado y el pellet se resuspendió en 100 µl de agua estéril grado HPLC, se colocó en Baño María a punto de ebullición y se centrifugó 10 min a 15,000 x g. El sobrenadante obtenido fue recolectado en un tubo Eppendorf® (1.5 ml) y utilizado como ADN plantilla.

3.5. CUANTIFICACIÓN DE ADN

Se colocaron 2 ml de buffer de cuantificación (10 µl de reactivo DIE con 500 ml de buffer TNE 0.5X) en un cubo limpio de cuarzo para calibrar el fluorómetro (Hofer DyNA Quant200 Bremen Alemania) a cero. Se agregan 2 µl de muestra de ADN a 2 ml de buffer de cuantificación, se colocó el cubo en la celda del fluorómetro y se tomó la lectura la concentración de ADN en ng/ml.

3.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La mezcla de PCR fue realizada utilizando 1µl de cada cebador derivados del ARN ribosomal 16S de 25 pares de bases (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTG-3' y 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACC-3'), 4.8 µl de agua estéril grado HPLC, 2 µl de buffer 10X, 0.7 µl de dNTP's (4mM con Mg Cl₂), 0.5 µl de Taq Polimerasa (5 U/ml) y 5 µl de la muestra de ADN.

El PCR fue realizado en un termociclador (PCR PTC-100 Programal Termal Controler MJR Mj Research Inc Texas, USA) con el siguiente programa: 95°C por 5 min; 38 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg y 72°C por 2 min; una fase final de 72°C por 10 min y enfriado a 15°C.

3.7. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

La preparación de la mezcla para la enzima de restricción EcoR I se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante de la siguiente manera: 7.5 µl de agua estéril grado HPLC, 2 µl de buffer RE 10X, 10 µl de producto de PCR y 0.5 µl de enzima de restricción. Las muestras fueron colocadas en Baño María a 37°C por 4 hr. Conforme al protocolo provisto por la compañía Promega (2005).

3.8. ELECTROFORESIS

Se realizaron dos comparaciones en la electroforesis. En la primera se utilizó un gel de agarosa al 1%, en la que se colocaron 17 µl de cada muestra de ADN amplificado y se le aplicó ~100 V (PS 250/2.5 amp Transphor/Electrophoresis. Hofer Scientific Instruments. San Francisco, California) por 1 hr.

La segunda electroforesis se realizó con un gel de agarosa al 2%, en la que se colocaron 17 μ l de cada muestra de de ADN amplificado sometido a digestión con la enzima de restricción EcoR I y se le aplicó ~100 V por 1.25 hr.

3.9. VISUALIZACIÓN

Los geles se colocaron en una solución de 10 mg/L de bromuro de etidio (EtBr) durante 30 min y la visualización se realizó en un transiluminador UV (Foto/UV 26 Texas, USA). Las fotografías se tomaron con una cámara Sony Cyber-shot (DS-W100 Japón) y se editaron con el programa Saint Shop Pro (v 9.1).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. AISLADO DE CEPAS

En la Figura 1 se puede diferenciar el crecimiento de *Lactobacillus* spp. en medio MOX con 30 µg/ml de Vancomicina (derecha) y MRS con 30 µg/ml de Vancomicina. Se obtuvieron mejores resultados con el segundo medio en donde se determinó un conteo de >250 UFC. Por esta razón se trabajó con las bacterias aisladas en el medio MRS con Vancomicina.

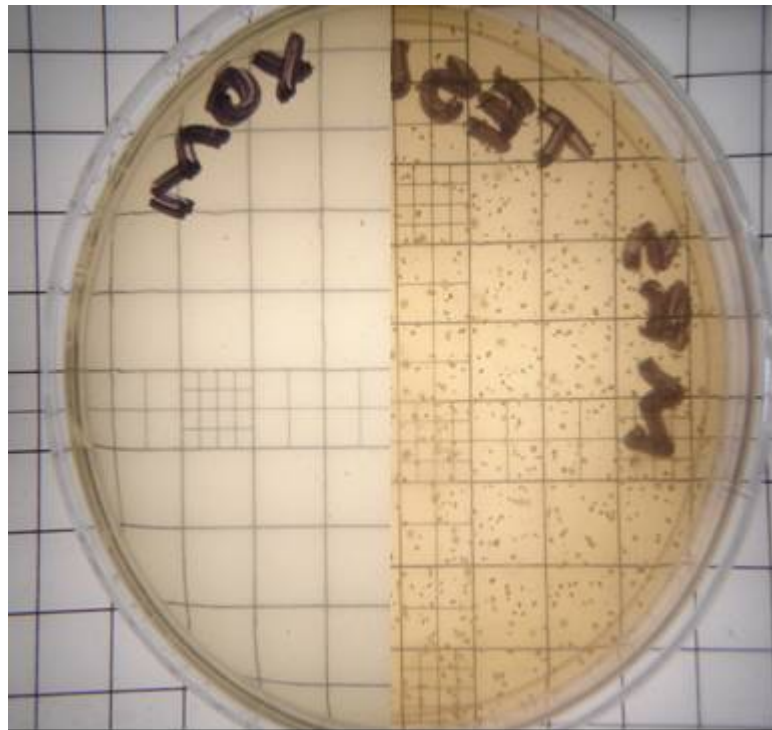


Figura 1. Comparación de cultivo de bacterias en medio MOX con 30 µg/ml de Vancomicina (izquierda) y MRS con 30 µg/ml de Vancomicina (derecha).

4.2. EXTRACCIÓN DE ADN

De las 39 muestras que fueron reproducidas por medio de rayado en medio MRS se seleccionaron las 28 muestras con mayor cantidad de UFC para realizar el proceso de extracción de ADN.

En el Cuadro 1 se observan los valores como resultado de la cuantificación de ADN realizada en el fluorómetro (Hoefer DyNA Quant 200 Bremen, Alemania) de las 28 muestras mencionadas. De estas se seleccionaron las 24 muestras con valores mayores, de esta manera se descartaron las muestras 10, 21, 32 y 37.

Cuadro 1. Cuantificación de 28 muestras de ADN (ng/ml) *Lactobacillus* spp. aisladas de queso fresco artesanal.

Muestra	Cuantificación ADN ng/ml	Muestra	Cuantificación ADN ng/ml
1	25	20	50
2	195	21	8
3	56	22	62
4	64	23	35
5	44	28	94
8	52	30	58
9	20	31	29
10	15	32	6
11	29	33	26
13	42	35	85
14	29	36	44
15	34	37	10
16	54	38	39
17	36	39	49

4.3. PCR, DIGESTIÓN CON EcoR I Y ELECTROFORESIS

Durante el análisis de los productos de PCR en el que se empleó un gel de agarosa al 1% para el proceso de electroforesis, estos productos no lograron ser visualizados. Sin embargo, la electroforesis que se realizó con el gel de 2%, se lograron visualizar bandas. Esto nos permite inferir que los fragmentos de ADN son pequeños, razón por la que no se lograba visualizar en el gel de 1% de agarosa.

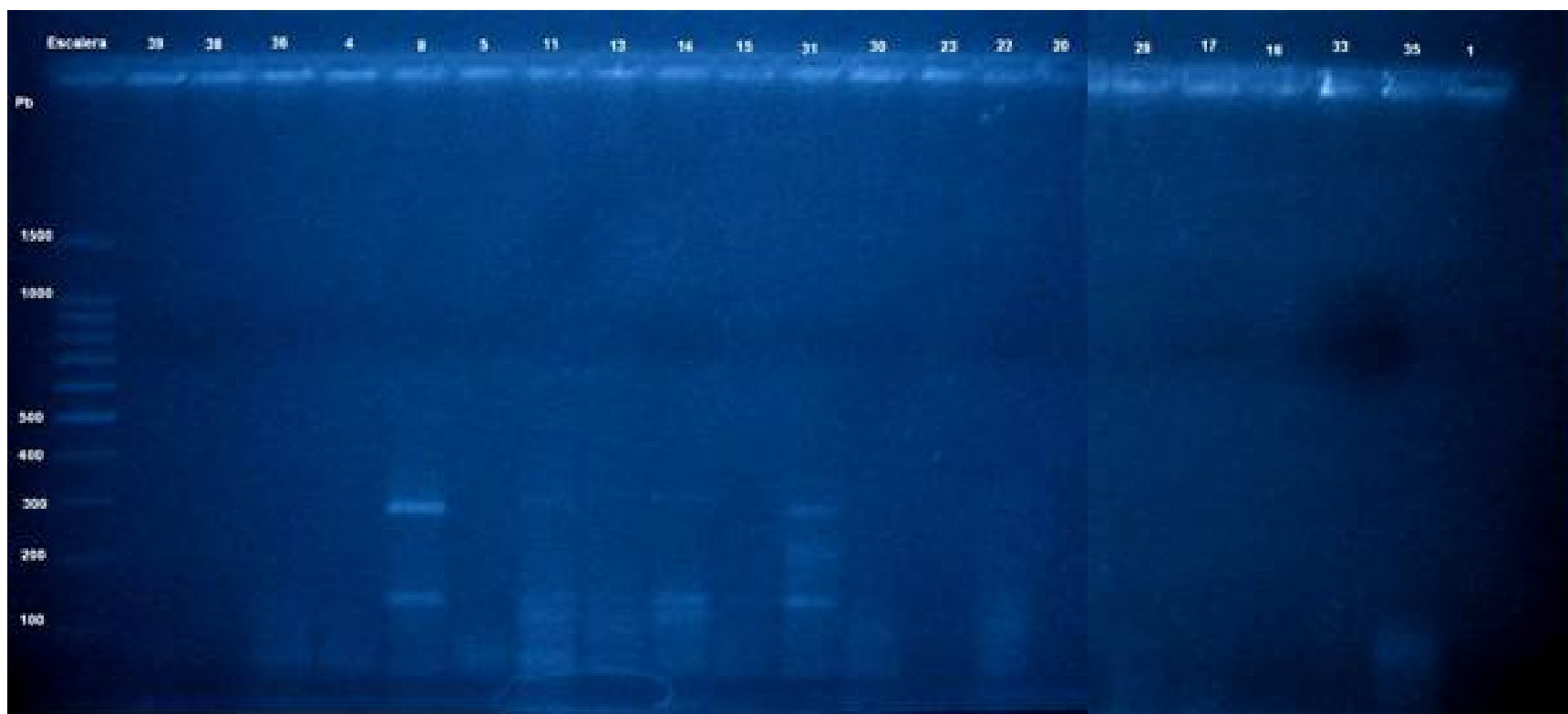


Figura 2. Visualización de PCR empleando ADN extraído de 21 cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de queso fresco artesanal en gel de agarosa al 2%.

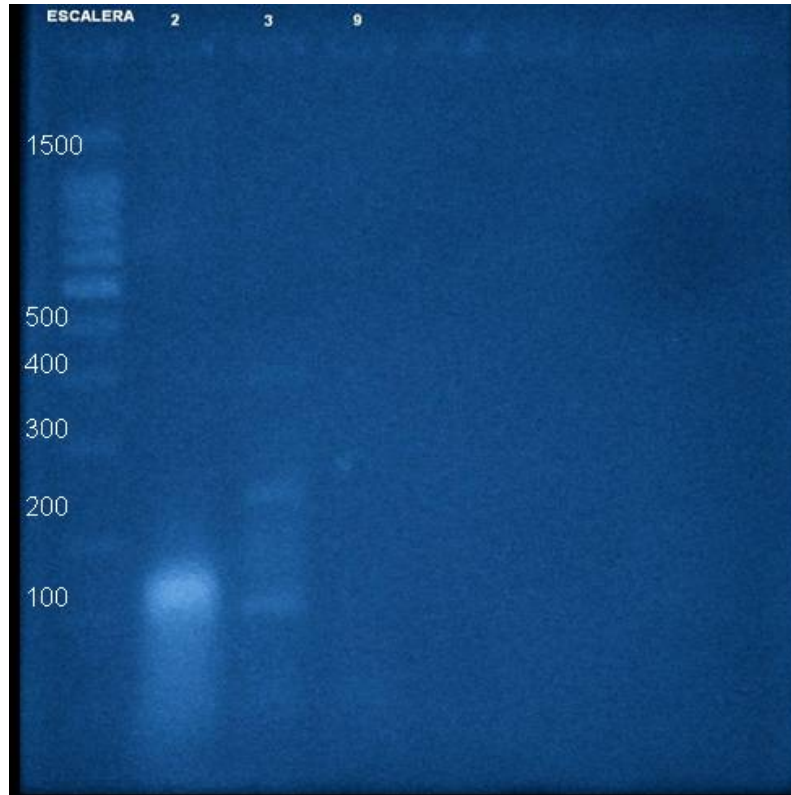


Figura 3. Visualización de PCR empleando ADN extraído de 21 cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de queso fresco artesanal en gel de agarosa al 2%.

Las Figuras 2 y 3 son el resultado del PCR de un total de 24 muestras sin enzimas de *Lactobacillus* spp. En estas se lograron diferenciar 3 distintos grupos de colonias. El primer grupo consiste en las muestras de ADN que no amplificaron; estas corresponden a las muestras: 39, 38, 23, 20, 17, 28, 16, 33, 1 y 9. La posible causa es por evaporación de la mezcla de PCR durante el proceso de replicación en el termociclador. El segundo grupo está formado por las cepas 36, 4, 5, 13, 15, 30, 22, 35 y 2; en este caso la amplificación de la banda se logra observar alrededor de los 100 pares de bases, finalmente el último grupo de cepas diferenciados son las cepas 8, 11, 14, 31 y 3 alrededor de las 400 pares de bases.

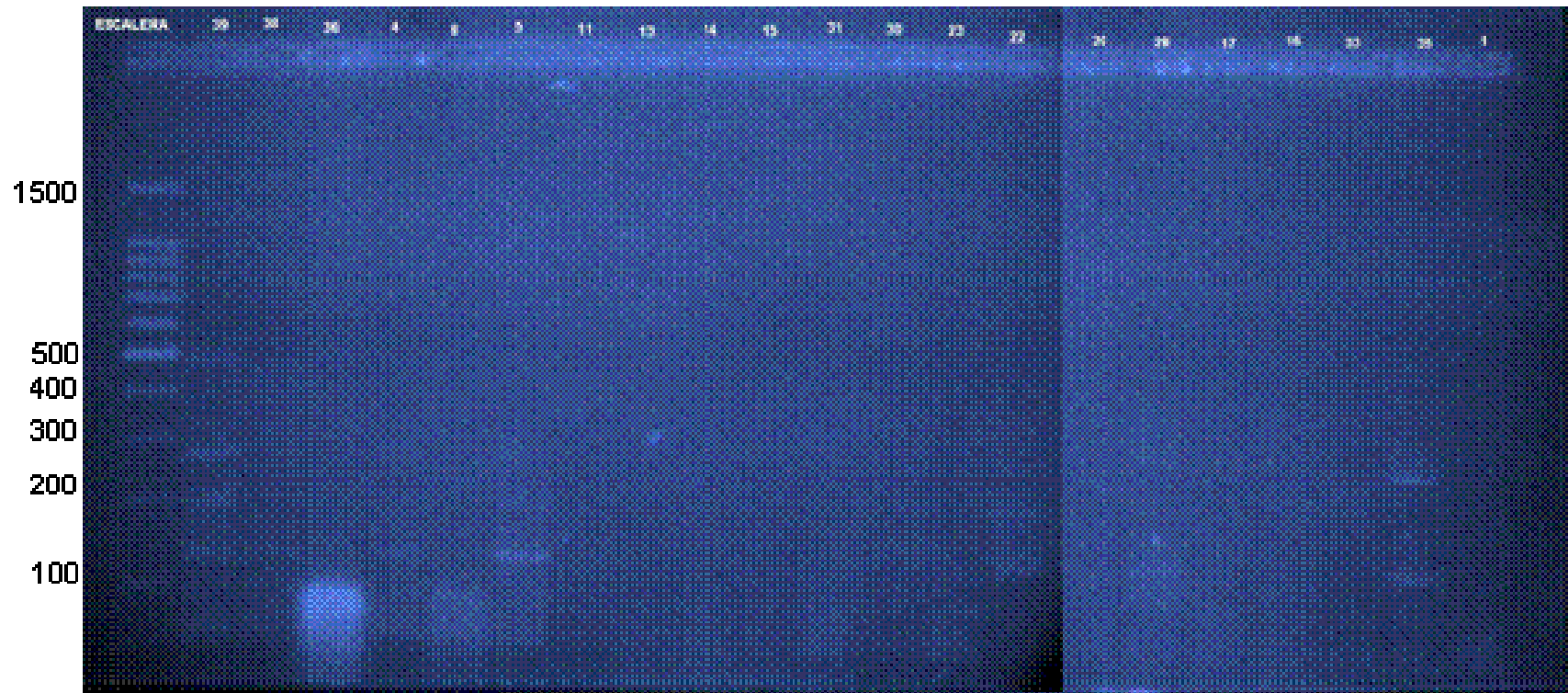


Figura 4. Visualización de producto de PCR empleando ADN extraído de 21 cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de queso fresco artesanal, digerido con EcoR I, en gel de garosa al 2%.

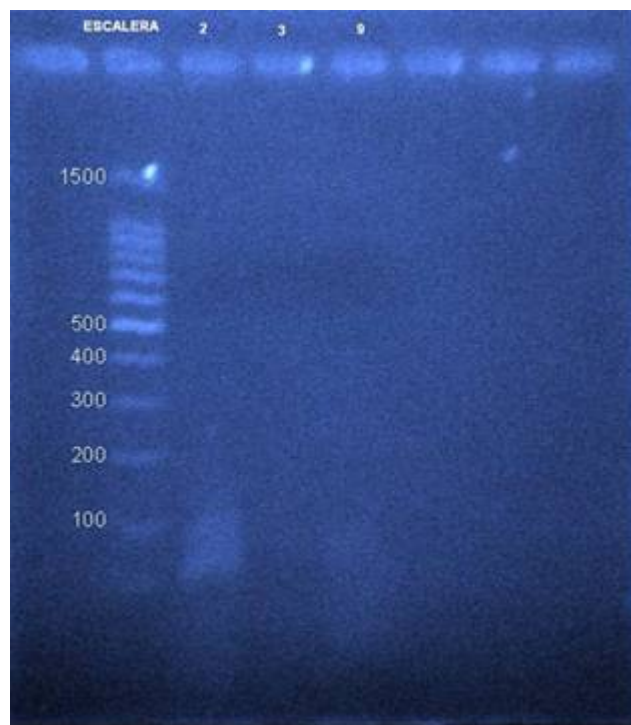


Figura 5. Visualización de producto de PCR empleando ADN extraído de 3 cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de queso fresco artesanal, digerido con EcoR I, en gel de agarosa al 2%.

En las Figura 4 y 5 se observan las muestras de colonias de *Lactobacillus* spp. digeridas con la enzima EcoR I, en las que se pueden diferenciar dos conjuntos por su similitud en el perfil de bandas observado. El primer conjunto está formado por: 5, 22, 35 y 28; el segundo conjunto formado por: 36, 8, 14, 31, 17 y 2. Existe una muestra que tiene comportamiento diferente, la 39; el resto de muestras no se lograron visualizar.

4.4. COMPARACIÓN ENTRE LOS PRODUCTOS DE PCR PUROS Y LOS PRODUCTOS DE PCR DIGERIDOS CON EcoR I:

Las muestras en que se observaron el mismo patrón de bandas, alrededor de las 100 pb, en la electroforesis realizada con los productos de PCR puros y la electroforesis de de los productos de PCR digeridos con EcoR I son: 2, 4 y 36.

Las muestras 5, 22 y 35 en la electroforesis realizada con los productos de PCR puros amplificaron a 100 pb y los productos de PCR digeridos con EcoR I amplifican a 400 pb. En el caso de la muestra 8 sin digestión por enzimas amplificó cerca de 400pb y con enzimas lo hizo a 100 pb. Los ejemplares 1, 28 y 39 sin digestión por enzimas no amplificaron; sin embargo con enzimas lo hace a 100, 400 y 500 pb respectivamente. Las muestras 3, 11, 14, 31 sin digestión enzimática amplificaron a 400 pb y con digestión

enzimática no lo hicieron. De similar forma las 13, 15 y 30 en la primera fase amplificaron cerca de 100 pb y en la segunda fase no se observa amplificación.

5. CONCLUSIONES

En el estudio se clasificaron 9 grupos de las 24 cepas *Lactobacillus* spp:

- Primera cepa: 5,22 y 35.
- Segunda cepa: 39
- Tercera cepa: 28
- Cuarta cepa: 2, 4 y 36
- Quinta cepa: 1
- Sexta cepa: 8
- Séptima cepa: 3, 11, 14, 31
- Octava cepa: 13, 15y 30
- Novena cepa: 15, 16, 17, 23, 33 y 38.

La mejor respuesta se observó en el tratamiento de MRS con Vancomicina a 30 µl/ml en este medio se aislaron las cepas más representativas y fueron resembradas en MRS para su propagación adecuada y mantener un banco genético fresco.

Los cebadores derivados del 16S ARNr de 25 pares de bases mostró ser funcional en la amplificación de ADN de *Lactobacillus* spp.

La enzima de restricción EcoR I es eficiente para mostrar si existen o no diferencias cuando se estudia el reconocimiento de especies de *Lactobacillus* spp.

6. RECOMENDACIONES

Evaluar las cepas aisladas en este estudio para la elaboración de quesos industriales a partir de leche pasteurizada, para comprobar su influencia en las características sensoriales de los quesos artesanales.

Realizar evaluaciones adicionales de la eficacia de la enzima de restricción EcoR I con diferentes tiempos de acción, concentraciones y fuentes de ADN.

7. BIBLIOGRAFÍA

Asociación Mexicana de Microbiología. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. Revista Latinoamericana de Microbiología. 45:1-2.

Baylor Collage of Medicine. 2005. Lab Protocols (en línea). Consultado el 25 de agosto de 2006. Disponible en: http://www.bcm.edu/physio/lab_pages/pedersen/protocols.html

Cristóbal, R y Maurtua, D. 2003. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias y Filosofía, Departamento de Microbiología y Parasitología. Lima, Perú. 7 p.

Coueret, V. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. Laboratoire de microbiologie alimentaire U.S.C INRA, Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, France. 38 p.

Erdourul Ö y Erbülür F. 2002. Isolation and Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various Foods. Department of Food Engineering, Faculty of Agriculture, Kahramanmaraß S.t. Ümam University, Turkey. 6 p.

FAO. 2003. Condiciones Estructurales, Evolución (1990-2000) y Perspectivas (2010, 2020, 2030) de Centro América. AGAL. Centro América. 54 p.

Fusco, A. 2005. Elaboración Artesanal no es lo mismo que producción a pequeña escala. El Universitario (en línea). Consultado el 15 de octubre de 2006. Disponible en: <http://eluniversitario.unne.edu.ar/2005/90/pagina/entrevista.htm>

KEYGENE. 2005. AFLP primers (en línea) Consultado el 23 de septiembre de 2006. Disponible en: http://www.keygene.com/technologies/technologies_aflp.htm

Padilla, G, Ramírez, E, Sabillón, L. 1996. Investigación de la Contaminación Microbiológica de Productos Lácteos Producidos en Forma Artesanal. Centro de Estudios y Control de Contaminantes CESCO. Tegucigalpa, Honduras. 42 p.

Meroth, C, Hammes, W, Hertel, C. 2003. Characterisation of the Microbiota of Rice Sourdoughs and Description of *Lactobacillus spicheri* sp. nov. Institute of Food Technology, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany. 9 p.

Promega. 2006. Protocols & applications (en línea). Consultado el 6 de agosto de 2006. Disponible en: <http://www.promega.com/paguide/chap1.htm>

Promega. 2006. Restriction Enzyme Usage Information. Promega Corp. Madison, USA. 1 p.

Tharmaraj, N, Shah, N. 2003. Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. School of Molecular Sciences Victoria University, Werribee Campus Australia. 9 p.

Vasek, O, Fusco, A, Giori, G. 2003. Elaboración de Queso Artesanal Correntino con Cepas Salvajes Seleccionadas. F.A.C.E.N.A.-U.N.N.E. Argentina. 4 p.

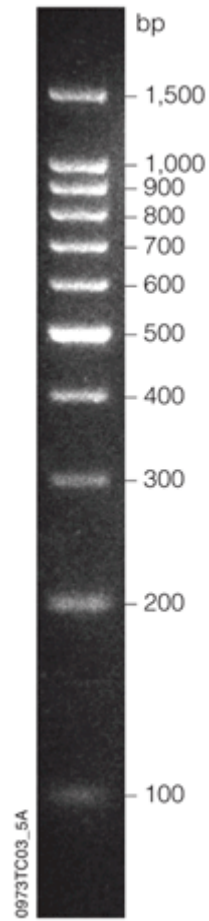
Vásquez A, Molin, G, Petterson, B, Antonsson, M, Ahrné, T. 2005. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. Division of Food Technology/Lab. of Food Hygiene, Lund University, Lund, Sweden. 12 p.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Carga microbiológica encontrada en las muestras de queso artesanal analizadas en Lima, Perú. (Cristóbal y Maurtua, 2003)

Muestra	Bacterias aerobias mesófilas (UFC/g)	Coliformes totales (NMP/g)	Coliformes fecales (NMP/g)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	<i>Enterococcus faecalis</i> (NMP/g)	<i>Lactobacillus</i> spp. (UFC/g)
1	2,8 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10	6,8 ≥ 10 ⁴	4,6 ≥ 10 ²	2,2 ≥ 10 ⁴
2	1,1 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	4,6 ≥ 10 ²	6	9,7 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	4,8 ≥ 10 ⁴
3	2,2 ≥ 10 ⁵	4,6 ≥ 10 ²	4,6 ≥ 10 ²	3	8,2 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	2,5 ≥ 10 ⁴
4	2,8 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,5 ≥ 10	7,3 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	2,2 ≥ 10 ⁴
5	2,1 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	4,6 ≥ 10 ²	2, 4 ≥ 10 ²	1,6 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	1,3 ≥ 10 ⁴
6	2,0 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,2 ≥ 10	8,2 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	4,4 ≥ 10 ³
7	7,2 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,6 ≥ 10	6,8 ≥ 10 ⁴	3,8 ≥ 10	1,9 ≥ 10 ⁴
8	10,6 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	Ausente	8,0 ≥ 10 ⁴	1,4 ≥ 10 ²	2,1 ≥ 10 ⁵
9	2,3 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	1,5 ≥ 10	7	7,3 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	7,4 ≥ 10 ⁴
10	5,5 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	2,7 ≥ 10	Ausente	6,5 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	1,3 ≥ 10 ⁴
11	2,7 ≥ 10 ⁵	3,3 ≥ 10	9,3 ≥ 10	2,3 ≥ 10	2,4 ≥ 10 ⁵	1,1 ≥ 10 ³	1,5 ≥ 10 ³
12	1,6 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	9	2,7 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	8,8 ≥ 10 ⁴
13	28,5 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	3,8 ≥ 10	1,3 ≥ 10 ⁶	1,9 ≥ 10	1,2 ≥ 10 ⁵
14	29,4 ≥ 10 ⁵	3,7 ≥ 10	4,4 ≥ 10	4,4 ≥ 10	5,6 ≥ 10 ⁴	1,1 ≥ 10 ³	2,2 ≥ 10 ⁵
15	3,0 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,2 ≥ 10	2,0 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	5,6 ≥ 10 ⁴
16	3,1 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10	3,7 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	5,3 ≥ 10 ⁴
17	28,1 ≥ 10 ⁵	1,1 ≥ 10 ³	4,6 ≥ 10 ²	2,4 ≥ 10 ²	7,2 ≥ 10 ⁵	3,1 ≥ 10	7,0 ≥ 10 ⁵
18	25,7 ≥ 10 ⁵	1,1 ≥ 10 ³	2,1 ≥ 10 ²	Ausente	6,6 ≥ 10 ⁴	3,8 ≥ 10	2,6 ≥ 10 ⁵
19	46,8 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	6	5,5 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ⁵
20	47,4 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,6 ≥ 10	Ausente	4,4 ≥ 10	5,5 ≥ 10 ⁴
21	49,4 ≥ 10 ⁵	1,4 ≥ 10 ²	> 1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ³	8,1 ≥ 10 ⁵	1,9 ≥ 10	4,7 ≥ 10 ²
22	37,8 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	2,3 ≥ 10	3,9 ≥ 10 ⁵	2,7 ≥ 10	2,9 ≥ 10 ⁵
23	31,8 ≥ 10 ⁵	2,1 ≥ 10	2,4 ≥ 10 ²	2,7 ≥ 10	1,4 ≥ 10 ⁵	2,7 ≥ 10	2,9 ≥ 10 ⁵
24	24, 6 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,6 ≥ 10 ⁴	1,6 ≥ 10	5,6 ≥ 10 ⁵
25	53,0 ≥ 10 ⁵	4,6 ≥ 10 ²	4	4	Ausente	1,4 ≥ 10 ²	3,0 ≥ 10 ²
26	51,4 ≥ 10 ⁵	1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ³	5,1 ≥ 10 ⁴	7	1,1 ≥ 10 ⁵
27	49,2 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	2,1 ≥ 10	2,7 ≥ 10 ⁴	9	2,3 ≥ 10 ⁵
28	78,0 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	4,6 ≥ 10 ²	8,7 ≥ 10 ⁴	> 1,1 ≥ 10 ³	7,2 ≥ 10 ⁵
29	76,4 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ³	1,9 ≥ 10 ⁵	1,4 ≥ 10 ²	6,7 ≥ 10 ⁴
30	21,7 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	3,3 ≥ 10	7,0 ≥ 10 ⁵	3,1 ≥ 10	2,4 ≥ 10 ⁴
31	0,12 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,0 ≥ 10 ⁶	8,6 ≥ 10	3,6 ≥ 10 ⁴
32	48,6 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	Ausente	3	1,8 ≥ 10 ⁶
33	1,4 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	1,1 ≥ 10 ³	3,3 ≥ 10	Ausente	Ausente	2,8 ≥ 10 ²
34	43,8 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	2,7 ≥ 10	9,4 ≥ 10 ⁵	1,9 ≥ 10	1,6 ≥ 10 ⁴
35	3,4 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,0 ≥ 10 ⁶	3,1 ≥ 10	7,6 ≥ 10 ³
36	14,7 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	8,6 ≥ 10	Ausente	3,7 ≥ 10	1,5 ≥ 10 ³
37	27,4 ≥ 10 ⁵	4,3 ≥ 10	4,3 ≥ 10	1,5 ≥ 10	9,4 ≥ 10 ⁵	2,7 ≥ 10	1,0 ≥ 10 ³
38	73,2 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	5,3 ≥ 10 ⁵	3,1 ≥ 10	4,7 ≥ 10 ³
39	46,4 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	> 1,1 ≥ 10 ³	1,4 ≥ 10 ²	8,3 ≥ 10 ⁵	> 1,1 ≥ 10 ³	3,6 ≥ 10 ³

ANEXO 2. Escalera utilizada como parámetro de amplificación. Promega 100bp DNA Ladder.



2% agarosa

9. TERMINOLOGÍA

9.1. PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION)

Según Promega el PCR es una manera simple de producir fragmentos pequeños específicos de ADN a partir de una plantilla de ADN in Vitro. Este método de clonar ADN solo requiere un par de horas. Para que exista la reacción se necesitan una serie de reactivos: agua, buffer, DdNTPs, primers, Taq polimerasa y el ADN plantilla (Promega, 2006).

9.2. REACTIVOS DE PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION)

9.2.1. dNTP's (Dideoxynucleotidos Trifosfatos)

Este reactivo contiene todos los nucleótidos necesarios para sintetizar la nueva secuencia de ADN. Existen cuatro tipos: DdATP, DdCTP, DdGTP, DdTTP.

9.2.2. Cebadores (Primers)

Son secuencias cortas de ADN responsables de la especificidad de la reacción de PCR. Son Oligonucleótidos que consisten de 20 a 50 pares de bases, que se pueden unir a las extremidades 5' a 3' de la secuencia de ADN plantilla. Estos cebadores están constituidos por un segmento de la cadena del ADN del organismo a detectar (KEYGENE. 2005).

Para utilizar el método de PCR se debe considerar que existen distintos tipos de cebadores, dependiendo del tipo de estudio que se quiera hacer: RAPD (Random Amplification of Polimorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region) y otros.

9.2.3. Enzima Taq Polimerasa

Es la enzima responsable de la síntesis de ADN. Esta es termo estable por lo tanto la temperatura óptima para su funcionamiento es a 72°C. La abreviación Taq procede de la bacteria *Thermus aquaticus*, que produce esta enzima.

9.2.4. Buffer

Es una solución que contiene iones de potasio (K) y magnesio (Mg), para mantener un pH aproximado de 8.4. El Mg es un elemento básico para la reacción de la enzima Taq polimerasa. Manipulando las concentraciones de Mg en la reacción se puede controlar la especificidad de la unión de los cebadores al ADN.

9.2.5. ADN plantilla

Es la muestra de ADN que se desea amplificar. El cebador tiene que ser específico para este ADN. Etapas del PCR

9.3. FASES PCR

9.3.1. Separación de las cadenas de ADN

Las dos cadenas de ADN esta unidas por medio de puentes de hidrogeno muy estables. Por lo tanto la desnaturalización de estos se la hace con calor o químicos. La más usual es por medio de calor, en la cual se alcanza una temperatura de 94-95°C.

9.3.2. Fase de hibridación

En esta fase se realiza la fijación de los cebadores a las cadenas de ADN, un cebador va de 5 á 3' y el otro al contrario cada uno en una cadena. Estos se unen al ADN en lugares específicos. La temperatura necesaria para esto es de 55-65°C

9.3.3. Fase de síntesis

En esta etapa se realiza la síntesis de ADN. Después de que los cebadores ya están unidos la Taq polimerasa entra en función y catalizan la síntesis utilizando los DdNTP's de acuerdo con la secuencia del ADN muestra. La temperatura de esta reacción es de 72°C, la síntesis termina cuando el termociclador alcanza la temperatura de 4°C (en el caso de este estudio se utilizaron temperaturas de 15°C).

Al terminar este proceso se obtienen dos moléculas idénticas de ADN a partir de un ejemplar. Este paso se repítete sucesivamente de 20-40 veces.

9.4. ELECTROFORESIS

El PCR esta asociado con la electroforesis, la cual nos ayuda a visualizar el ADN e interpretar los resultados. La electroforesis es un método por el cual se separan las moléculas dependiendo de su tamaño y configuración. Este proceso se realiza en un gel de azarosa o de poliacrilamida, aplicando corriente eléctrica (Asociación Mexicana de Microbiología. 2003).

Los ácidos nucleicos tienen carga negativa por lo tanto migran hacia el polo positivo. Las moléculas de menor tamaño migran de manera más rápida. Factores de variación de las moléculas en el gel son:

- PH del Buffer
- Tamaño del poro del gel
- Aplicación de la corriente eléctrica

Al preparar el gel se utiliza un “peine” el cual hace hoyos en el gel, en los cuales se depositan las muestras obtenidas del PCR. El número de hoyos depende del peine, que es removido después de que el gel solidifica. En el cebador hoyo se pone un marcador molecular, el cual sirve de guía o referencia (Baylor Collage of Medicine, 2005).

La solución de ADN es visible gracias a un colorante que se le aplica. Después de la electroforesis se deposita el gel en una solución con bromuro de etilo. Este hace posible la visualización de las bandas, ya que este se intercale entre ellas. Este paso se debe hacer en presencia de luz ultravioleta. Finalmente se saca una foto, con la cual se dan los resultados y conclusiones.