



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ITAPÚA

MAESTRIA BIOTECNOLOGIA EN ALIMENTOS



Dirección de Postgrado

Curso de Maestría en Biotecnología en Alimentos

**“Búsqueda de cepas productoras de
fermentación láctica en Queso
Paraguay”**

Oscar Manuel Álvarez Duarte

Tutor:

Pedro Zapata

Encarnación – Paraguay

2020

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Antecedentes de las BAL.....	2
Funciones de las BAL.....	5
Bacteriocinas	6
Antecedentes del queso Paraguay	7
Maduración de queso	7
Ingredientes del queso Paraguay	8
Procedimiento de obtención del queso	8
Condiciones Higiénico-sanitarias de elaboración del queso	9
BAL usualmente presentes en queso	10
Agentes contaminantes del queso.....	10
OBJETIVOS	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
Búsqueda de BAL y recuento de coliformes.....	15
Composición y preparación de los medios de cultivo	15
Cultivo y aislamiento de BAL.....	15
Identificación de BAL	16
Preparación de cultivo iniciador.....	17

RESULTADOS	19
Recuento de coliformes totales	19
Identificación con Maldi tof.....	20
Recuento de coliformes con BAL incorporados	21
Identificación por Biología Molecular.....	24
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES.....	28
BIBLIOGRAFIA.....	30
ANEXO	34
DOCUMENTOS COMPLEMENTARIOS	37
Primer informe de cepas BAL analizadas por el método Maldi tof.....	37
Segundo informe de cepas BAL analizadas por el método Maldi tof.....	38
Identificación molecular de un aislado bacteriano mediante el marcador 16S	39

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme tener y disfrutar de mi familia.

A mi familia por el apoyo en cada decisión.

A la UNI, por abrir sus puertas al desarrollo profesional.

A mi tutor por el acompañamiento y ayuda invaluable.

Al Conacyt, por dar la oportunidad de concretar este paso importante en mi carrera.

Al equipo técnico del laboratorio de FaCyT, por la gran ayuda que me brindaron.

A todas las personas que colaboraron en la realización del trabajo final.

RESUMEN

El queso Paraguay corresponde a la categoría “artesanal”, puesto que su elaboración se realiza en pequeñas fincas sin los tratamientos térmicos y los controles de calidad sanitarios que deberían aplicarse a la leche cruda. En esta última, pueden encontrarse en forma natural las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) que son autóctonas de cada zona, además de otros microorganismos de crecimiento sinérgico con las BAL, responsables de ciertas características organolépticas y fisicoquímicas como sabor, olor, textura y acción antimicrobiana del producto final. El queso, al ser artesanal, está expuesto a una variedad de microorganismos contaminantes, que si no son controlados, pueden ser una fuente potencial de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). El trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Ciencias y Tecnologías dependiente de la Universidad Nacional de Itapúa (UNI) tomando muestras de leche cruda y queso fresco obtenidos de una finca lechera. El objetivo del trabajo fue aislar las BAL autóctonas en el queso Paraguay y determinar los géneros más comunes presentes en el producto con miras a generar un consorcio de microorganismos que pudiera utilizarse tecnológicamente para elaborar y mejorar el queso Paraguay organoléptica y microbiológicamente, aprovechando las propiedades que estas bacterias brindan a los alimentos mediante la secreción de diferentes productos de su metabolismo. Para la obtención de los resultados fue realizado un estudio de tipo descriptivo, tipo prospectivo de corte transversal, que abarcó los meses de septiembre del 2017 a febrero del 2018. Durante la maduración del queso se esperó que las BAL, mediante la fermentación de la lactosa y la disminución del pH, controlarían la proliferación de los microorganismos contaminantes como los coliformes totales. La evolución de los coliformes se monitoreó al inicio y a los días 7, 15 y 30 durante la maduración del queso. Las BAL presentes fueron aisladas mediante el cultivo selectivo agar MRS (Man, Rogosa, Sharpe). Las cepas aisladas fueron analizadas por espectrometría de masas mediante la tecnología Maldi tof (Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight – mass spectrometry). Se determinó la presencia de *Weissella confusa*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paralimentarum* y *Gluconobacter oxydans* (*G. oxydans*). Sin embargo, las determinaciones no fueron concordantes entre las muestras enviadas, en dos etapas. Una de las cepas además fue tipificada por Biología Molecular para comparar los resultados proporcionados por el Maldi tof, resultando esta un género y especie totalmente diferente. Por otro lado, las pruebas realizadas mediante el agregado de la supuesta BAL al queso Paraguay no modificaron el número de coliformes totales ya que al final la cepa

adicionada fue *G. oxydans* sin propiedades antimicrobianas, por lo que se recomienda eliminarlas del grupo inicial.

Palabras claves: queso Paraguay; bacterias ácido lácticas; microorganismos contaminantes, efecto antimicrobiano

SUMMARY

Paraguay cheese falls into the “artisan” category, since it is made on small farms without the heat treatments and sanitary quality controls that should be applied to raw milk. In the latter, the Lactic Acid Bacteria (BAL) that are indigenous to each area can be found naturally, in addition to other microorganisms of synergistic growth with the BAL, responsible for certain organoleptic and physicochemical characteristics such as taste, odor, texture and antimicrobial action of the final product. The cheese, being artisanal, is exposed to a variety of contaminating microorganisms, which, if not controlled, can be a potential source of Foodborne Illness (FAD). The research work was carried out in the Science and Technology laboratory dependent on the National University of Itapúa (UNI) taking samples of raw milk and fresh cheese obtained from a dairy farm. The objective of the work was to isolate the autochthonous BALs in Paraguay cheese and determine the most common genres present in the product with a view to generating a consortium of microorganisms that could be used technologically to make and improve Paraguayan cheese organoleptically and microbiologically, taking advantage of the properties that these bacteria provide food by secreting different products of their metabolism. To obtain the results, a descriptive, prospective cross-sectional type study was carried out, which covered the months of September 2017 to February 2018. During the maturation of the cheese, it was expected that the BAL, by means of lactose fermentation and the decrease in pH will control the proliferation of contaminating microorganisms such as total coliforms. Coliform evolution was monitored at baseline and on days 7, 15, and 30 during cheese maturation. The BALs present were isolated by selective MRS agar culture (Man, Rogosa, Sharpe). The isolated strains were analyzed by mass spectrometry using Maldi tof technology (Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight - mass spectrometry). The presence of *Weissella confusa*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paralimentarum* and *Gluconobacter oxydans* (*G. oxydans*) were determined. However, the determinations were not concordant between the samples sent, in two stages. One of the strains was also typified by Molecular Biology to compare the results provided by Maldi tof, resulting in a totally different genus and species. On the other hand, the tests carried out by adding the supposed BAL to the Paraguay cheese did not modify the number of total coliforms since in the end the added strain was *G. oxydans* without antimicrobial properties, so it is recommended to eliminate them from the initial group.

Keywords: Paraguay cheese; lactic acid bacteria; contaminating microorganisms, antimicrobial effect

INTRODUCCIÓN

Las BAL son un amplio grupo de microorganismos presentes como flora normal de los mamíferos (Goldstein, Tyrrell y Citron, 2015). Son utilizados desde la antigüedad por las aplicaciones beneficiosas por los cambios que producen en la leche y derivados, entre ellos el queso, otorgándoles sabores, textura, olores sobresalientes y aumentando la vida útil mediante la transformación y secreción de componentes de su metabolismo en el producto final.

La producción de queso resulta muy rentable por el valor cultural que representa en la mesa tradicional paraguaya, aunque no se tienen en cuenta los requisitos para la correcta elaboración, como ser la conservación adecuada, la pasteurización de la leche, la utilización de recipientes no estériles, infraestructura apta para la producción, salazón, la introducción de cepas lácticas; que hacen que el alimento sea una fuente potencial de ETAs.

El objetivo del trabajo fue aislar, identificar y seleccionar las BAL autóctonas en el queso Paraguay y determinar los géneros más comunes presentes en el producto con miras a generar un consorcio de microorganismos que pudiera utilizarse biotecnológicamente en una de las etapas de elaboración del queso. Esto se lograría mediante la pasteurización de la leche y la consecuente eliminación de los microorganismos contaminantes como las bacterias coliformes, para posteriormente introducir en la leche una concentración de BAL autóctonas conocidas, aumentar de esta manera su vida útil por las propiedades antimicrobianas y mantener sus características organolépticas.

Para ello, el trabajo investigativo se compone de 5 capítulos detallados a continuación.

Capítulo I: se desarrolla el marco teórico con acopio breve de puntos importantes referentes al fenómeno de estudio con la respectiva cita bibliográfica.

Capítulo II: En el mismo se presenta los Objetivos y el Marco Metodológico estableciendo tipo de estudio, periodo y área de estudio, recolección de datos y técnicas. Se detallan los materiales, métodos y técnicas empleadas para la obtención de la información.

Capítulo III: Se expone el análisis de los resultados.

Capítulo IV: Discusión de estudio.

Capítulo V: Se establece las conclusiones parciales y finales del objeto de estudio, así como la Bibliografía, el Anexo y Documentos complementarios.

Capítulo I



Antecedentes de las BAL

Las BAL autóctonos de cada región están adaptadas al medio ambiente en el cual evolucionaron logrando características particulares que pueden ser beneficiosas para el hombre, ya sea por los cambios físicos-químicos que ocurren en los productos alimenticios, por los efectos contra los microorganismos contaminantes que pueden producir descomposición de los alimentos, o por la inhibición de potenciales patógenos que pueden producir ETA.

En cuanto a la taxonomía, las BAL pertenecen al phylum Firmicutes. Están ampliamente distribuidas en el ecosistema, poseen alrededor de 20 géneros, siendo el *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, los más frecuentemente encontrados en los quesos elaborados a partir de leche cruda. De ellos el *Lactobacillus* (*L.*) resulta el más grande del género (Parra Huertas, 2010; Medeiros *et al.*, 2016)

La primera clasificación de las BAL, fue iniciada por Orlando Jensen en el año 1919, como organismos Gram positivos variables en cuanto a morfología, no formadores de esporas, carentes de movilidad y catalasa negativos (Salvadogo A. *et al.*, 2006 cito en Parra Huertas, 2010).

Con respecto a su capacidad fermentativa, las BAL pueden dividirse en dos grandes grupos, las homofermentativas y las heterofermentativas de acuerdo a su producto final. La diferencia entre ellas radica en que, mientras que las homofermentativas producen ácido láctico como producto primario de fermentación a partir de la glucosa utilizando a la aldolasa como catalizador y actuando más directamente, las heterofermentativas producen además del ácido láctico, otros productos de la fermentación de la glucosa, entre los que se puede citar dióxido de carbono (CO₂), ácido acético y etanol, utilizando la ruta alterna de la pentosa monofosfato para dicha fermentación. En los heterofermentativos, los seis azúcares de carbono se transforman en cinco utilizando a la enzima fosfocetolasa, dando como producto aldehído y diacetil, que son sustancias aromáticas y potenciadoras del sabor codiciadas en la industria alimenticia, especialmente en la láctea. (Carr, Chill y Maida, 2002)

Entre las BAL homofermentativas se pueden destacar los géneros *Streptococcus* y *Pediococcus*. Las heterofermentativas componen los géneros *Leuconost* y la *Betabacteria*, esta última formando parte del género *Lactobacillus* (Carr, Chill y Maida, 2002).

Para identificar las BAL la técnica de Maldi-tof (Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight – mass spectrometry), se ha utilizado en los últimos años como una

muy buena alternativa para la detección de microorganismos patógenos, esto mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales (2-20 KDa), por medio de la creación de un espectro de masas específicos para cada género y especie (Maldonado, Robledo y Robledo, 2018).

En la industria de los alimentos son muchos los microorganismos que pueden provocar enfermedades, siendo el Maldi tof un método rápido para la detección de los mismos mediante el análisis de sus metabolitos (Huertas, Urbano y Torres, 2019)

A continuación, se describirán a rasgos generales algunas especies de la especies BAL.

Lactobacillus brevis

Un bacilo Gram positivo, catalasa negativo que está ampliamente distribuido en el medio ambiente y tiene varias aplicaciones biotecnológicas.

Este bacilo se caracteriza por la capacidad inhibitoria sobre diferentes microorganismos, tanto Gram positivo como Gram negativos, mediante la producción de bacteriocinas y otros productos de su metabolismo como lo son los ácidos orgánicos, peróxidos, CO₂ (Ogunbanwo, Sanni y Onilude, 2003b).

La composición de las bacteriocinas varía de una especie a otra, así como la capacidad inhibitoria sobre los diferentes microorganismos, como lo demuestra el trabajo realizado en alimentos fermentados en Nigeria, donde cepas de *L. brevis* y *L. plantarum*, presentaban bacteriocinas de distintas estabilidades y capacidades inhibitorias debido a su diferente composición (Ogunbanwo, Sanni y Onilude, 2003a).

Algunas cepas de *L. brevis* son utilizadas por la capacidad que poseen de hidrolizar compuestos de hemicelulosas por lo que se los puede utilizar para ensilaje con la consiguiente liberación de ácido láctico conjuntamente con el *L. pentosus*, así como la reducción de desechos agrícolas (Garde *et al.*, 2002).

Estudios realizados por Garcia Gonzalez et al. (2017), demostraron que el *L. brevis* actúa más eficazmente en presencia de otra BAL. La *Weissella* actúa en sinergismo junto al *L. brevis* en la inhibición de un peligroso patógeno responsable de ETAs como es la *Listeria monocytogenes* (Garcia Gonzalez, E.; Garcia Salazar, A.P.; Rojas Dorado, M.C.; Ordoñez–Artunguaga, D. A.; Serna Cock, 2017)

En las industrias de destilería los desechos obtenidos son tratados con *L. brevis* para la obtención del ácido gamma-amino butírico (GABA), producto con múltiples aplicaciones a nivel fisiológico (Yokoyama, Hiramatsu y Hayakawa, 2002) por lo que su utilidad es también a nivel medicinal.

Lactobacillus paralimentarius

Bacteria perteneciente al género *Lactobacillus* aislada en Japón por Cai y otros, a partir de masa fermentada de maiz (Pang *et al.*, 2011). Se caracteriza por ser una bacteria Gram positiva, catalasa negativa, anaeróbica facultativa, heterofermentativa, sin la producción de gas a partir de la glucosa similar fenotípicamente al *Lactobacillus alimentarius* (Cai *et al.*, 1999), pero con un patrón de fermentación de carbohidratos muy diferente de ribosa, D-xilosa, galactosa, ametil-D-glucósido, β -gentiobiosa, lactosa, melibiosa, melecitosa, rafinosa, D-tagatosa y gluconato (Pang *et al.*, 2011). El mismo es utilizado como probiótico para la restitución de la flora bacteriana intestinal (Parra Huertas, 2010)

Lactobacillus plantarum

Estrada *et al.* (2005), en Colombia, determinaron que los extractos crudos y centrifugados de *L. brevis* y *L. plantarum* poseen actividad antibacteriana sobre cepas de *Salmonella sp.* y de *Escherichia coli*(*E. coli*) en medio ácido por la producción compleja de extractos compuestos por ácidos orgánicos y peptídicos, según las condiciones ambientales a las que son sometidas, generando el *L. plantarum* mayor inhibición del crecimiento bacteriano que la otra BAL. Refieren que conjuntamente, las BAL actúan sinérgicamente, potenciando así la acción bactericida (Estrada Maldonado, Gutiérrez Ramírez y Montoya Campuzano, 2005; Garcia Gonzalez, E.; Garcia Salazar, A.P.; Rojas Dorado, M.C.; Ordoñez–Artunguaga, D. A.; Serna Cock, 2017).

En pacientes geriátricos, los descensos de niveles de bifidobacterias y el incremento de bacterias patógenas afectan la microbiota intestinal saludable, deteriorando el estado de salud del paciente. En estudios a doble ciego realizados en España, se ha observado que cepas de *L. plantarum* actúan como probiótico y como estimulante del sistema inmunitario, mejorando el estado general de las personas de edad avanzada a las que se les trató con cepas de *L. plantarum* (Bosch Gallego *et al.*, 2011).

Los beneficios y facilidades que demostró el *L. plantarum* fueron inmensos, la actividad antimicrobiana y el aumento de la inmunidad, debido su capacidad de resistir el paso por el intestino y colonizar el tracto intestinal humano propiciaron la creación de una vacuna viable

mediante su consumo como probiótico, ya que el mismo también es utilizado como cultivo iniciador tanto en alimentos industrializados como en alimentos artesanales debido a su aporte a la textura, olor y sabor (Vries *et al.*, 2006).

Específicamente la utilización de la cepa de *L. plantarum* PH04 tiene propiedad hipocolesteromiantes ampliamente probada en ratones, en donde se redujeron las concentraciones de colesterol con la administración de esta cepa junto con su alimentación, por lo que se está intentando su incorporación como probiótico en las poblaciones en donde se observa un alto índice de accidentes cerebrovasculares (Nguyen, Kang y Lee, 2007).

Weissella confusa (W. confusa)

La *W. confusa*, es una BAL Gram positiva, no esporulada, catalasa negativa, presente en una gran variedad del medio ambiente como vegetales frescos, alimentos fermentados, productos cárnicos y rumen bovino, caracterizada industrialmente por la producción de bacteriocinas, no definidas específicamente cuales, pero que le dan la acción antimicrobiana frente a organismos patógenos como son la *E. coli* y la *Klebsiella pneumoniae* (Serna Cock & Enríquez Valencia, 2013), pudiendo utilizar la cepa purificada como probiótico para mejorar la funcionalidad de células vivas intestinales, además de su acción antimicrobiana contra cepas de *L. monocytogenes* (Serna-Cock *et al.*, 2012; Garcia Gonzalez, E.; Garcia Salazar, A.P.; Rojas Dorado, M.C.; Ordoñez–Artunguaga, D. A.; Serna Cock, 2017)

Su utilización como probiótico también fue estudiada, utilizando como medio de consumo barras de cereales de diferentes gustos, donde la *Weissella* fue introducida en su interior, presentando una buena aceptación por parte de los consumidores catadores, etc, superior al 50% (Serna-Cock, Angulo-López y Ayala-Aponte, 2015).

Otro método utilizado para conservar la viabilidad de las células de *W. confusa* para su utilización como probiótico es la encapsulación de las mismas en gel de Aloé vera, presentando mayor viabilidad que la encapsulación en paracaseinato de calcio al 10%. (Serna-Cock, Liliana; Vallejo–Castillo, Vladimir; Garcia–Gonzalez, 2012)

Funciones de las BAL

Entre las funciones que se le atribuyen a las BAL se destacan la producción de las bacteriocinas secretadas por las mismas, las cuales no poseen toxicidad ni producen metabolitos secundarios en células eucariotas, y que presentan una alta inhibición sobre patógenos. La síntesis de acetaldehído y diacetilo en pequeñas proporciones lo que le da el aroma y el sabor

levemente ácido agradables, los huecos u ojos del queso que lo hacen esponjoso por la producción de gas, especialmente de CO₂ (Parra Huertas, 2010; Heredia-Castro *et al.*, 2017), además de sus aplicaciones a otros tipos de alimentos no solamente los de origen lácteo (Mondragón Preciado *et al.*, 2013).

A pesar de la no toxicidad de los metabolitos de las BAL en células eucarióticas como se mencionó anteriormente, la única bacteriocina permitida es la nisina, conforme a lo expresado por Heredia Castro *et al.* (2017, p. 341):

“Solo la bacteriocina nisina, producida por Lactococcus Lactis, es considerada segura para el consumo humano (GRAS, del inglés Generally Reconized As Safe) de acuerdo a la Food and Drug Administration (FDA) de los EEUU, se sabe que no forman compuestos secundarios al biodegradarse en el tracto gastrointestinal”.

Como cultivos iniciadores de fermentación en la industria láctea se utiliza la subespecie *bulgaricus* y *lactis*, en tanto que en fermentaciones vegetales se utilizan *L. delbrueckii* ssp (Singh *et al.*, 2009).

Las acciones sobre la leche y sus derivados, no solo se deben a la presencia exclusiva de BAL, puesto que la presencia de otros sinnúmeros de microorganismos no tan conocidos, colaboran en la producción de diferentes metabolitos que influyen en las características finales de los productos artesanales.

Bacteriocinas

Las bacteriocinas consisten en péptidos sintetizados por ciertas bacterias, entre ellas ciertas BAL, utilizados contra patógenos o contaminantes en biopreservación, extensión de la vida útil de un producto, acción antimicrobiana y control de fermentaciones (Agudelo *et al.*, 2015).

Mecanismo de acción

La mayoría de las bacteriocinas secretadas por las BAL utilizan como mecanismo de acción la perforación de la célula mediante la formación de poros en la membrana celular. Esto se inicia mediante la atracción de las cargas positivas de las bacteriocinas interactuando con fosfolípidos de la membrana bacteriana cargados negativamente por fuerzas electrostáticas. Esto, añadido a la naturaleza anfipática de las bacteriocinas hace que se distribuyan ampliamente a lo largo de la superficie de la membrana celular bacteriana (Heredia-Castro *et al.*, 2017). Finalmente, una vez instaurado el poro, se produce la liberación de compuestos

como fosfato, potasio, aminoácidos, adenosin tri fosfato (ATP), sin que pueda producirse la cantidad necesaria de macromoléculas para la actividad bacteriana y la lisis celular resultante (Mondragón Preciado *et al.*, 2013).

Antecedentes del queso Paraguay

La elaboración del queso Paraguay data de hace varios siglos, formando parte de la cultura paraguaya en la cocina tradicional para la elaboración de comidas típicas como la “sopa paraguaya”, el “mbeju”, el “chipa” o el “kavure”, en los cuales según el grado de maduración del queso es destinado para uno u otro uso. En la sopa paraguaya, el mbeju y el kavure el queso se utiliza fresco, mientras que en el chipa, es utilizado el producto madurado o viejo puesto que le da un sabor especial a los alimentos.

En Paraguay los pequeños y medianos productores comúnmente cuentan en sus fincas con ganado vacuno del cual obtienen la leche para el consumo diario. En la mayoría de los casos el excedente no consumido resulta destinado a la fabricación de queso Paraguay y de esa manera, evitar desperdicios de la leche. El queso se destina para el consumo familiar o en muchos casos, constituye la fuente primaria de ingresos económicos, dedicándose varias familias exclusivamente a la fabricación del queso y su comercialización en los mercados de la zona, puesto que resulta un producto muy apreciado por su diversidad de uso.

El queso Paraguay, consiste en un alimento de color blanquecino rico en grasas, proteínas y ciertos microorganismos cuyos metabolitos le dan el olor, color y sabor característico; se obtiene a partir de la coagulación de la leche fresca no pasteurizada, por lo que al queso resultante se lo clasificaría como artesanal.

Maduración de queso

El queso Paraguay se conocen empíricamente por ser “nuevos o viejos” (frescos o maduros), dependiendo del tiempo transcurrido desde la elaboración, aunque en los pequeños tambos (establecimiento destinado al ordeño, producción y venta de leche) no se tiene un estándar de temperatura, humedad y condiciones de conservación para la maduración de los mismos y esta se realiza de manera empírica. No obstante la “Norma Paraguaya para el queso Paraguay NP 25 053 11” regulada por el Instituto Nacional de Tecnología, Normalización y Metrología (INTN), la cual establece que la conservación y comercialización del queso Paraguay se debe realizar a una temperatura no superior a los 8°C.

Los “quesos frescos” (Fig. 1), son aquellos que recién elaborados se proceden a su venta, siendo la manera más empleada en la comercialización en los mercados, puesto que posee mayor cantidad de suero, mayor peso y por lo tanto más rentable económicamente. Son de color blanco, aspecto blando y poseen un sabor levemente salado y ácido suave.

“Los quesos maduros” (Fig. 2), se elaboran de manera empírica, son aquellos quesos en los que ha pasado un tiempo desde su elaboración hasta su comercialización. La mayoría lo comercializa en estado fresco y es el comerciante o el consumidor final el que lo hace madurar en la heladera o en temperaturas por debajo del punto de congelación. Una vez maduro el queso presenta un color amarillo, textura exterior dura, de olor y sabor fuerte, a veces hasta amargo.

Ingredientes del queso Paraguay

Se utilizan dos ingredientes básicos que son la leche y el material coagulante (cuajo o renina concentrada). Para un kilo de queso se emplean 10 litros (L) de leche cruda sin pasteurizar, en tanto que la sal es opcional y su utilización es poca o nula en las fincas lecheras.

En tanto que la norma Paraguaya (NP) expresa que el queso debe poseer tres ingredientes obligatorios que son: la leche pasteurizada, el cuajo y/u otras enzimas coagulantes apropiadas y por último un cultivo de bacterias específicas. La citada norma establece que el cloruro de sodio y el cloruro de calcio son opcionales.

La leche a ser utilizada puede ser de oveja, cabra, u otro animal, pero generalmente se utiliza la leche de vaca obtenida por ordeño ya sea manual o con ordeñadoras mecánicas.

El cuajo utilizado en la fabricación del queso es obtenido de los mataderos de la zona, es sometido a una limpieza con agua no potable y conservados en estado de congelación hasta el momento de su utilización (Fig. 3a y 3b). La porción de cuajo a ser utilizada es empapada con el zumo de algún fruto cítrico, generalmente limón o naranja agria (apepu). Una vez finalizado su utilización en la elaboración del queso, el cuajo es lavado, secado al sol y puesto a refrigerar para posteriormente repetir los procesos anteriormente citados

Procedimiento de obtención del queso

En la elaboración del queso Paraguay se requieren dos procedimientos básicos. Uno de ellos, consiste en la coagulación o cuajado de la leche generalmente cruda, puesto que los “artesanos” refieren la no pasteurización de la leche por la pérdida de las características organolépticas del queso. Esto es más bien por la no utilización de cultivos iniciadores, dadas que las BAL iniciales son eliminadas con la pasteurización.

La coagulación se realiza por dos métodos tradicionales. Uno de los métodos consiste en la adición de renina concentrada, pudiendo encontrar dicho producto en forma de polvo o en gotas, las cuales se pueden adquirir en los comercios (Fig. 4).

El segundo método, más tradicional y antiguo, utiliza el cuajo para la precipitación de la fracción K (kappa) de la micela de caseína de la leche, lo que la hace coagular por la acción de la quimosina (Sánchez Valdés, 2016).

En la fabricación del queso son empleados los mismos recipientes de plástico en los cuales se recolectó la leche cruda, introduciendo en ellos el cuajo anteriormente nombrado, el cual es impregnado con algún zumo cítrico para acelerar el cuajado. Una vez producida la cuajada, es trasvasada a la quesera de madera utilizada para contener y dar la forma al queso. La quesera consta de una tela que permite la expulsión del resto de suero. Posteriormente, en la parte superior del queso, se apoya un objeto de peso considerable para ayudar a lograr una mayor deshidratación del queso por un proceso mecánico de prensado.

Una vez terminado el proceso de elaboración, el mismo es sometido al transporte, almacenamiento y venta en los mercados y almacenes, en donde el producto se expone a los contaminantes ambientales.

Otro proceso no siempre realizado por los productores de queso es la maduración, la cual no posee un procedimiento “estándar” en nuestro país. El proceso se realiza exponiendo al queso al medio ambiente o en el mejor de los casos, conservados en refrigeración o a temperaturas cercanas al punto de congelación, retardando así la descomposición.

En el proceso de elaboración del mencionado queso no se agrega ningún tipo de conservante así como tampoco es utilizada la salazón, utilizada en la mayoría de los quesos para atribuir al producto propiedades antimicrobianas.

Condiciones Higiénico-sanitarias de elaboración del queso

En todos los pasos de elaboración, el queso va adquiriendo una variedad de contaminantes. Desde la recolección de la leche, en la mayoría de los pequeños tambos, la ubre de la vaca que se encuentra en los corrales está al descubierto y en contacto con el ambiente que la rodea, incluyendo lodo, pasto, insectos y con ellos microorganismos, ya sean contaminantes o patógenos. Además, la ubre del nombrado animal no suele ser desinfectada, sino que es lavada vagamente con agua (no siempre potable). No se utilizan guantes, ni se desinfectan las manos antes del ordeño, lo que aumenta la cantidad de posibles contaminantes. Durante el ordeño, la leche, depositada en recipientes de plástico o aluminio, es dejada a un costado del lugar de

ordeñe hasta recolectar una cantidad considerable o de varias lecheras, aumentando la carga de microorganismos por la no refrigeración inmediata de la leche.

Por último, con respecto a la leche en sí, cabe nombrar la falta de pasteurización que imposibilita la disminución de la carga de microorganismos presentes. En cuanto a la producción del queso que se inicia con la cuajada, donde el cuajo natural, es el más utilizado por las pequeñas fincas, es reutilizado varias veces secándose al sol y sin las condiciones estériles.

La separación del cuajado y el suero, así como la comercialización del producto se realizan a temperatura ambiente, convierten al queso Paraguay en una potencial fuente de contaminación y transmisión de ETAs.

BAL usualmente presentes en queso

El estudio de secuenciación de amplicones de alto rendimiento realizado en productos lácteos de la India, refiere que las bacterias de los géneros *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae* y *Acetobacteraceae* eran las predominantes. Entre las BAL se hallaron en mayor proporción los *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus helveticus*. En el grupo de las *Acetobacteraceae* se encontró elevada la presencia de *Acetobacter spp.* y *Gluconobacter spp.* (Shangpliang *et al.*, 2018).

Agentes contaminantes del queso

La contaminación del queso puede estar causada por varios agentes. Estos pueden ser físicos, químicos y biológicos. Entre los agentes físicos pueden destacarse elementos de metal, madera, vidrio, etc. Los insecticidas, rodenticidas, fertilizantes, y restos de detergente, constituyen algunos los agentes químicos. Los agentes biológicos incluyen bacterias y/o sus toxinas, virus, hongos, y elementos parasitarios (Sánchez-valdés *et al.*, 2016; Huertas, Urbano y Torres, 2019). La mayor causa de contaminación la constituye la bacteriana, por la no pasteurización de la leche, siendo la última un caldo de cultivo excelente por los nutrientes que presenta en el medio acuoso, propicio para el desarrollo de patógenos y contaminantes, que en pacientes inmunocomprometidos, pueden alterar gravemente la salud del portador (Sánchez-valdés *et al.*, 2016).

Las bacterias con capacidad de producir ETA pueden diferenciarse en dos grandes grupos (Huertas, Urbano y Torres, 2019). Uno de ellos, incluye a las bacterias responsables de producir infecciones, capaces de multiplicarse en el tracto gastrointestinal, citándose en dicho grupo a las especies *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio parahemolyticus*, *Yersinia*

enterocolitica, especies termófilas de *Campylobacter* spp, *E. coli* enteropatógena, *Streptococcus* spp, entre otras.

En tanto que las que componen el otro grupo, producen toxinas causantes de intoxicación alimentaria como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum*. Ambos grupos presentes en alimentos que requieren alta manipulación en sus procesos y en aquellos listos para el consumo expuestos en mercados y tiendas, sin las condiciones de conservación adecuadas (Huertas, Urbano y Torres, 2019).

Esto ocurre en parte por las condiciones socio-ambientales de obtención de leche y elaboración de quesos, en donde los productores ya en el momento del ordeño no cuentan con la infraestructura o servicios sanitarios básicos (electricidad y agua potable) para asegurar la inocuidad del producto, siendo la leche generalmente recolectada en recipientes plásticos, los cuales no son sometidos a una desinfección previa, contaminando directa o indirectamente el producto.

Capítulo II



OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar las BAL autóctonas encontradas en el queso Paraguay, determinar los géneros encontrados y su efecto antimicrobiano sobre los microorganismos coliformes contaminantes del queso Paraguay.

Objetivos específicos

- 1) Aislar cepas lácticas presentes en el queso
- 2) Evaluar el comportamiento de los coliformes con el tiempo de maduración del queso
- 3) Tipificar las BAL presentes en el queso Paraguay por método Maldi tof y Biología Molecular

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño metodológico/tipo de estudio.

Según el nivel de profundidad del conocimiento, la investigación es descriptiva puesto que se interrelacionan los factores que influyen y que determinan los de los fenómenos que se estudian. Corresponde a un estudio prospectivo, de corte transversal, implicando los meses de septiembre del 2017 a febrero del 2018 con muestras obtenidas de una finca lechera.

El trabajo cuenta con variables cualitativas y cuantitativas, por lo que corresponde a una investigación con enfoque mixto, implicando la integración y discusión de los datos en base al tema de estudio.

Descripción del lugar de la investigación.

La toma de muestra de leche y queso de fue realizada en una finca lechera en la compañía de Mbutuy ubicada a 10 km del casco urbano de la ciudad de Coronel Bogado, Itapúa, Paraguay. La compañía se dedica principalmente a la agricultura, la ganadería y al rubro lechero. Este último rubro tiene capacitaciones constantes mediante convenios con la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA).

La investigación se llevo a cabo en el laboratorio de la facultad de Ciencias y Tecnologías, Universidad Nacional de Itapúa.

Toma de muestra.

Las muestras fueron recolectadas solicitando el permiso de una proveedora de queso Paraguay que comercializa en la zona. Fue comunicada el fin del trabajo y la misma accedió a proveer la muestra de leche cruda, así como del queso fresco en la finca en donde se realiza el ordeño.

La alícuota de leche fue de 250 cc, el queso fresco para la búsqueda de BAL de 1000 g, y el queso en el cual fue introducida la BAL aislada y el queso control fueron de 250 g. Los mismos se recolectaron con extrema higiene utilizando guantes y barbijos. Posteriormente, las mismas fueron transportadas al Laboratorio de la UNI el mismo día de la recolección de la muestra, en envases estériles y herméticos, que a su vez fueron inmediatamente colocados en recipientes secundarios refrigerados, evitando romper la cadena de frío y la interferencia de otros microorganismos diferentes a los proporcionados por las muestras tomadas.

Cuestiones éticas

Declaración de Helsinki.

Se han solicitado los permisos correspondientes para la elaboración del trabajo.

La presente investigación no contempla experimentación que pueda comprometer la salud de las personas.

Principios Bioéticos:

Se respetó en todo momento la confidencialidad y los datos que fueron proporcionados por el sujeto, mismos que no fueron utilizados en ningún momento para un fin lucrativo o de intereses propios. Los residuos generados durante el transcurso de la investigación, fueron correctamente clasificados, descontaminados y eliminados, cuidando el medio ambiente y a los sujetos que puedan estar en contacto con ellos.

Principios Individuales formulados por la UNESCO.

En cuanto a los principios individuales formulados por la UNESCO, se respetó la dignidad humana y el sujeto fue verbalmente informado y puesto a consideración su aceptación a ser partícipe del estudio

Principios sociales formulados por la UNESCO.

Se mantuvo en todo momento la confidencialidad. No existen riesgos de revelar información sobre la condición de las muestras proporcionadas por el sujeto, respetando y cuidando en todo momento su reputación, sin discriminar la diversidad cultural.

Búsqueda de BAL y recuento de coliformes

Composición y preparación de los medios de cultivo

Se prepararon los caldos de cultivo de MRS (Man, Rogosa, Sharpe), de agua peptonada, al igual que los agar base con MRS y Mac Conkey según el inserto de los fabricantes de la siguiente manera.

Caldo MRS: se suspendió 55,25 gramos (g) del polvo en 1 l de agua purificada. Se dejaron reposar 5 minutos (min), para luego calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición durante 1 a 2 min para disolución total. Distribuyo en recipientes apropiados y para su posterior esterilización en autoclave a 121°C por 15 min.

Caldo agua peptonada: se disolvieron 20 g del medio deshidratado en 1 l de agua destilada. Se dejaron reposar por 5 min aproximadamente. Se calentó por 1 min hasta disolver completamente. Posteriormente se vertieron en frascos adecuados según la necesidad y se esterilizo en autoclave a 121°C por 15 min.

Caldo Mac Conkey: Se agregaron 40 g a 1 L de agua destilada, se homogeneizo y distribuyo en recipientes con los tubos de Durham. Se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 min.

Caldo MRS con Agar Base: se preparó utilizando 20 g de Agar base en 1 L de caldo MRS preparados a partir de la suspensión de 55,25 g por L de agua purificada.

Coloración de Gram (RenyLab): una vez seleccionadas las colonias y fijadas al cubreobjetos se cubren con solución de violeta cristal 1% por el tiempo de un minuto, a continuación se lavaron con agua para eliminar el resto del colorante. Se dejó escurrir el cubreobjetos y se cubrió con solución 2% de lugol por un minuto, para volver a lavar con agua. Escurrir el resto de agua y lavar por un lapso de 20 segundos con solución decolorante de etanol al 96 GL y volver a lavar con agua. Cubrir finalmente con solución de fucsina 0,05% por 30 segundos, lavar con agua y dejar secar para su posterior observación microscópica.

Cultivo y aislamiento de BAL

Las muestras se mantuvieron refrigeradas antes y durante el transporte hasta el laboratorio de Ciencias de Tecnologías dependiente de la UNI, distante a unos 60 kilómetros del lugar de la toma de muestra. Al llegar al laboratorio se tomó una alícuota de la leche y una porción de queso por separadas y colocarlas en proporción 1:10 en agua peptonada (450

militros (ml) de caldo y 50 g de queso/50 ml de leche respectivamente en erlenmeyer (Fig. 5). Transcurridas las 24 horas de incubación a 37°C en condiciones aeróbicas, se realizaron diluciones hasta 10^{15} en medio MacConkey, los cuales se incubaron a 35 ± 2 °C de modo que se determinó, 24 horas más tarde, la carga microbiana de partida presente de bacterias contaminantes, especialmente de coliformes totales tanto en la leche como en el queso Paraguay (Fig. 6). Se calculó el NMP (número más probable) de coliformes totales según tabla de probabilidades para serie de 3 tubos. Este procedimiento se repitió con el queso en los días 7, 15 y 30 de modo que se observó el comportamiento de las poblaciones de microorganismos contaminantes con el transcurrir de los días para la maduración del queso.

Al mismo tiempo, y en forma paralela fueron sembradas una porción de queso, elaborada con la misma leche también analizada como se explicó en páginas anteriores, fue sembrada una porción de queso en proporción 1:10 (25g en 225 ml de caldo) en medio de cultivo caldo MRS (Man Rogosa Sharpe) los cuales fueron incubados a 30 y 45 °C de modo a facilitar el desarrollo de BAL mesófilos y termófilos (Fig. 7). Una vez transcurridas 48 horas, se observó los crecimientos macroscópicos en los tubos MRS con la siguiente comprobación de que las bacterias desarrolladas fueran bacilos Gram positivo. Se procedió a sembrar desde los caldos MRS a placas de Petri con MRS agarizado, preparado previamente con caldo MRS mezclado con agar base, esterilizado y distribuido convenientemente. Las placas se incubaron 24 horas a temperaturas de 30 y 45 °C, esperando el desarrollo de las posibles cepas BAL.

Identificación de BAL

Las colonias Gram positiva que desarrollaron en el medio MRS agarizado fueron rotuladas, embaladas y remitidas al Centro Médico de la Costa, en la ciudad de Asunción, Paraguay, único centro que cuenta con el equipo Maldi tof, las cuales brindan servicios a terceros para la tipificación de los materiales remitidos

Una vez halladas las posibles cepas BAL mediante el método Maldi tof, se procedió a la confirmación del género y especie, mediante la contratación de un servicio tercerizado encargado del procesamiento, análisis e informe de la cepa enviada en medio MRS al Laboratorio de Biotecnología Molecular (BiotecMol) – FCEQyN – Univ. Nacional de Misiones, Argentina.

Preparación de cultivo iniciador

Se prepara con *L. paralimentarius* perteneciente a la cepa desarrollada a 35 ± 2 Cr agregando a la leche en una proporción 1/50 con una concentración de 10^5 McFarland (100 ml de cultivo iniciador en 4900 ml de leche) la cual fue transformada posteriormente en queso

Capítulo III



RESULTADOS

Recuento de coliformes totales

Se obtuvo el recuento de para coliformes totales en el material de partida que fue la leche, identificando la presencia de los citados coliformes mediante el viraje de color en el medio MacConkey (Método Británico) con la consiguiente formación de gas en la campana de Durham. Lo observado fue cotejado con tablas estadísticas según NMP basadas en lo proporcionado por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF del inglés International Commission on Microbiological Specifications For Foods).

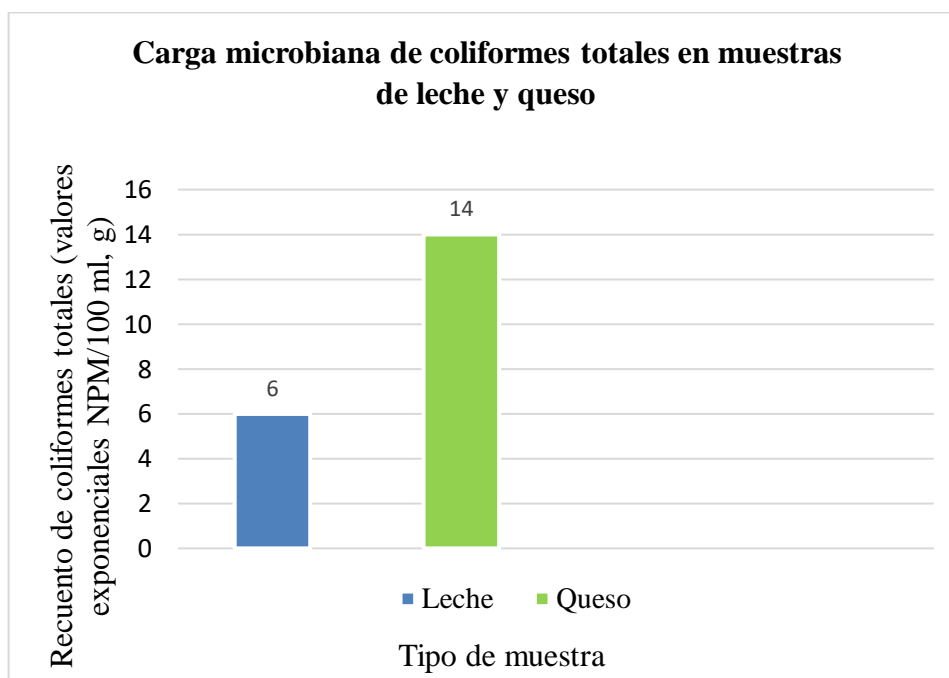


Gráfico 1. Carga microbiana de coliformes totales en muestras de leche y queso

El recuento de coliformes totales arrojó un valor de $2 \cdot 10^6$ NPM/100 ml de leche. Sin embargo, en el queso fresco obtenido a partir de dicha leche, el cual pasó por todas las etapas más críticas del procedimiento, se observó un valor muy por encima siendo $1,1 \cdot 10^{14}$ NPM/100 g de queso (Gráfico 1).

Se procedió a observar el recuento de coliformes totales del queso Paraguay con respecto al tiempo determinando los valores semanales.

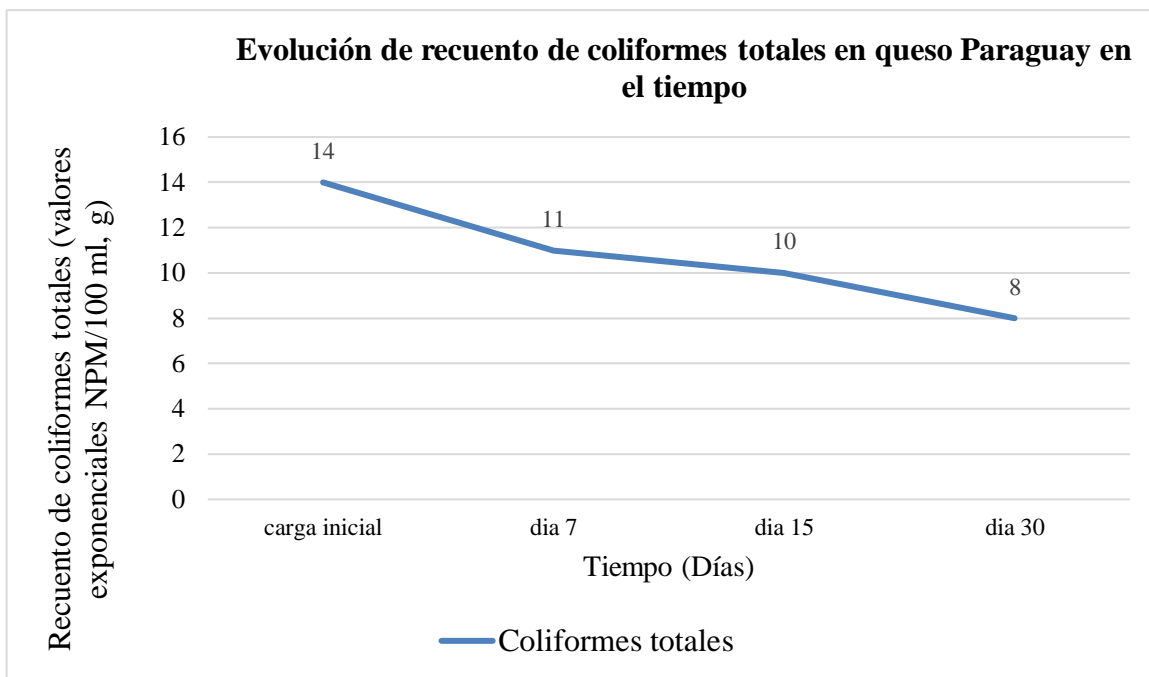


Gráfico 2. Evolución de recuento de coliformes totales en queso Paraguay en el tiempo.

En el queso, el recuento de coliformes totales con el transcurrir de la maduración disminuyó paulatinamente, obteniendo a los 7 días un valor de $7,5 \cdot 10^{11}$ NPM/100 g, a los 15 días de $1,5 \cdot 10^{10}$ NPM/100 g y de $7 \cdot 10^8$ NPM/100 g a los 30 días (Gráfico 2).

Identificación con Maldi tof

Del cultivo de la muestra de queso en agar MRS se logró identificar macroscópicamente dos tipos de colonias según temperaturas de incubación (30 y 45°C) y de características muy similares durante todo este periodo de tiempo. En ambas temperaturas de incubación las características morfológicas de las colonias eran similares, unas colonias grandes y otras de menor tamaño (Fig. 8), que a la tinción del Gram coincidieron con las características buscadas, la de ser Bacilos Gram Positivo (Fig. 9).

Una vez aisladas y repicadas en la última siembra a los 30 días, las cepas seleccionadas que más tiempo permanecieron durante la maduración, fueron enviadas a un laboratorio de la ciudad de Asunción, Paraguay para su identificación mediante la utilización del método de espectrometría de masas Maldi tof.

Durante el procesamiento las cepas tuvieron el inconveniente de la identificación de colonias, puesto que fueron enviadas siete cepas, distribuidas en tres placas. Una placa con cepas aisladas a 35 ± 2 °C identificadas como Cremosas (cr), pequeñas (p) y cepa dos (2), otra placa con las cepas obtenidas de la incubación a 45 °C identificadas como chicas (ch) y

grandes (G) y una última placa con dos cepas obtenidas también a 45 °C como cepas chicas (ch) y grandes (G) (Fig. 10).

Por el método Maldi tof fueron identificaron los siguientes BAL (Ver Documentos Complementarios pág. 37)

- *Lactobacillus brevis*
- *Weissella confusa*
- *Lactobacillus plantarum*

El informe emitido por dicho centro de diagnóstico no identificó la cepa y temperatura a las que correspondían las colonias estudiadas, por lo que se tuvo que realizar un segundo envío pero esta vez solo cuatro cepas, dos pertenecientes a las que desarrollaron a 35±2 °C (Cr y p) y dos a las que desarrolladas a 45 °C (ch y G), para de esta manera conocer con exactitud a qué tipo de colonias pertenecían y de la temperatura de incubación de la cual provenían.

En el segundo envío los resultados emitidos fueron distintos a los resultados al primero, siendo el único microorganismo aislado *L. paralimentarius* en los cultivos desarrollados a 35±2 °C (Cr y p) y 45 °C (ch y G) respectivamente (Ver Documentos Complementarios pág. 38).

Recuento de coliformes con BAL incorporados

Una vez halladas las posibles cepas BAL mediante el método Maldi tof, se procedió a la confirmación del género y especie de cepa identificada como Cr que desarrollo a la temperatura de 35±2. Esta cepa fue enviada a un laboratorio de la ciudad de Posadas, Argentina

Mientras se realizaban la extracción, ampliación y purificación del material genético se procedió a avanzar en los estudios, en donde la cepa (Cr) de “*Lactobacillus paralimentarius*” informada por el Maldi tof se incorporó a la leche, con la cual se fabricó el Queso con BAL. Este procedimiento permitió observar el comportamiento del queso “control” junto al que se le incorporó una carga microbiana BAL conocida.

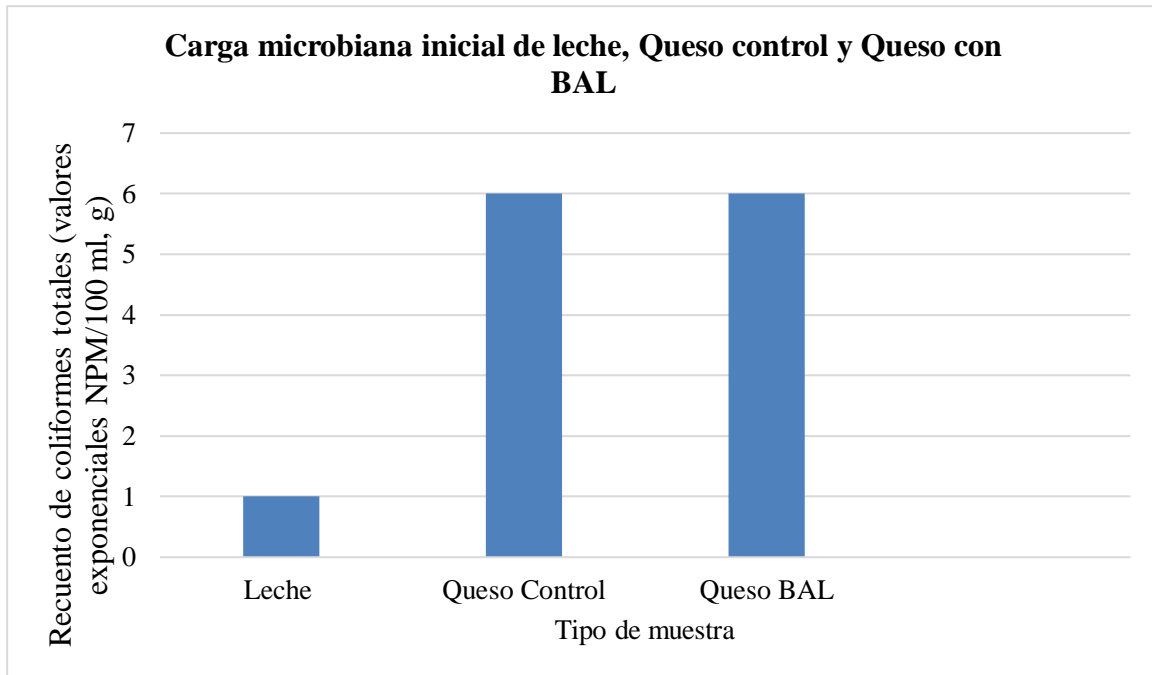


Gráfico 3. Carga microbiana inicial de leche, Queso control y Queso con BAL

Se procedió a su repique y control de los coliformes totales al inicio, a los días 0, 7, 15 y 30 respectivamente, en los cuales no se observaron cambios significativos en el queso control como en el queso con la BAL incorporada ya en ambos casos se obtuvo un recuento de 2.10^6 NMP/100 g y en la leche de partida fue de 70 NMP/100 ml (Gráfico 3).

Evolución del recuento de coliformes totales en el queso con BAL con respecto a un queso control

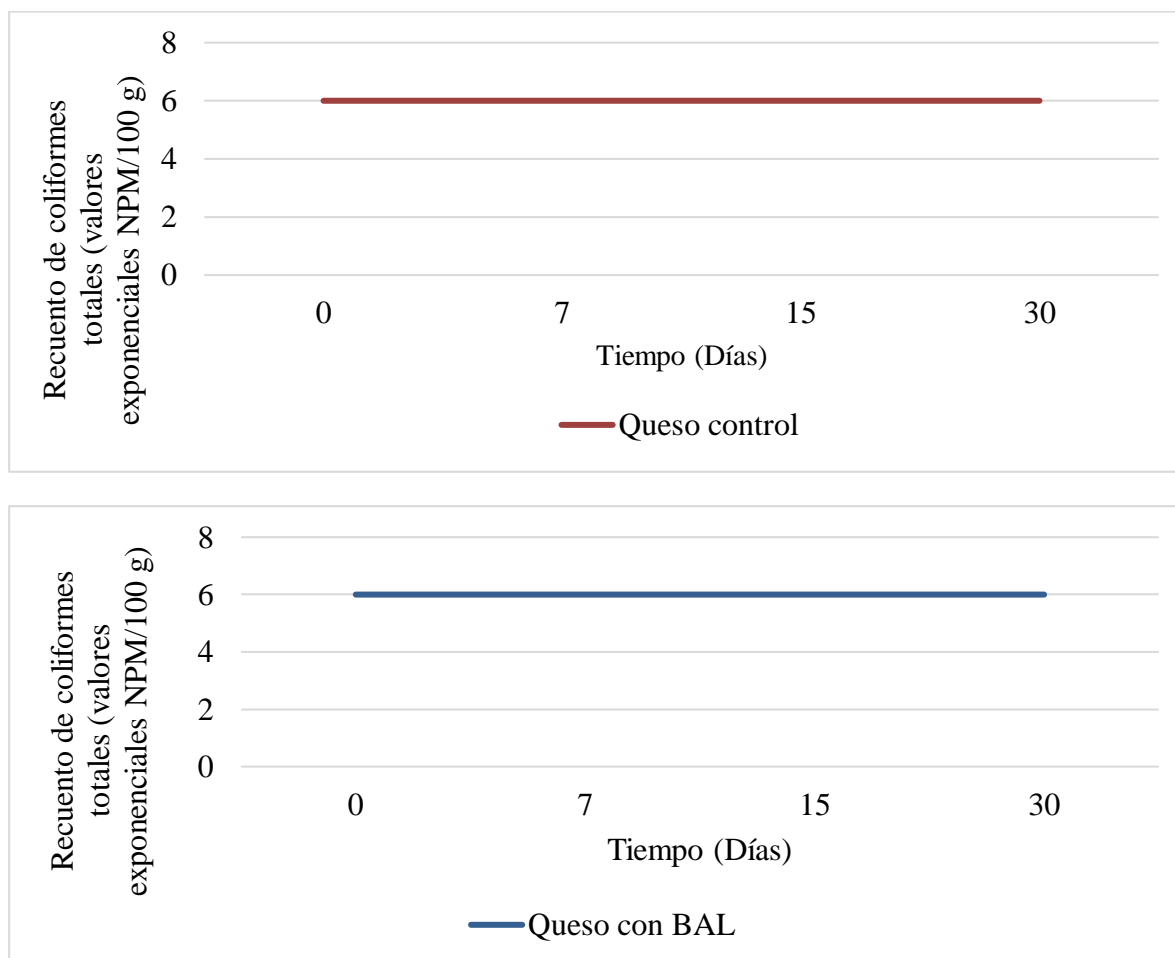


Gráfico 4. Evolución del recuento de coliformes totales en el queso con BAL con respecto a un queso control

El seguimiento del queso se realizó como en la primera etapa midiendo la cantidad de coliformes totales a los días 0, 7, 15 y 30 respectivamente tanto en el queso control (arriba) como en el queso con BAL introducida (abajo), sin observarse variaciones respecto al valor reportado inicialmente de $2 \cdot 10^6$ NPM/ 100 g de queso (Gráfico 4).

Identificación por Biología Molecular

La cepa identificada como *L. paralimentarius* por el método Maldi Tof fue enviada a la ciudad de Posadas Argentina, al Laboratorio de Biotecnología Molecular (BiotecMol) la cual se encargó de su recepción, y procesamiento mediante los protocolos establecidos por institución. El laboratorio luego del procesamiento y evaluación emitieron el informe el cual presenta un elevado índice de identidad con una bacteria reportada como *Gluconobacter oxydans* (ver documentos complementarios pág. 39).

El resultado arrojado por la identificación molecular (*G. oxydans*) es totalmente diferente a los resultados obtenidos por la tecnología Maldi tof (*L. paralimentarius*) realizados con anterioridad. Esto, supone que la misma fue contaminada en el último repique realizado antes de la amplificación del genoma, una mala interpretación por el método Maldi tof, o la coexistencia de ambas cepas durante todo el trabajo de campo realizado donde no se pudieron separar o identificar por la morfología de sus colonias.

Capítulo IV



DISCUSIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) ampliamente distribuidas en el ambiente, formando parte de la flora animal y vaginal humana (Goldstein, Tyrrell y Citron, 2015), tienen capacidades biotecnológicas ampliamente comprobadas mediante la producción de enzimas y metabolitos que son aprovechadas desde la antigüedad, mediante la síntesis de ácidos orgánicos (ácido láctico), peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, especialmente en la producción de diferentes tipos de derivados lácteos, influyendo sobre la textura, sabores, aromas característicos y de valor nutricional, así como la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias indeseables (Castro *et al.*, 2016). En las Norma Paraguaya NP 25 053 11 relacionada con el Queso Paraguayo manifiestan la utilización de un cultivo iniciador con bacterias específicas, sin especificar cuáles deberían utilizarse, por lo que sería de mucha utilidad estandarizar las cepas que mantengan las características organolépticas del queso Paraguayo que manifiestan los productores, razón por la cual evitan la pasteurización de la leche, ya que con este tratamiento térmico las BAL presentes naturalmente son eliminadas y con ellas el valioso aporte que ellas brindan al queso, sin dejar de mencionar los efectos inhibitorios sobre los contaminantes.

El consumo de quesos frescos representa uno de los mayores riesgos para contraer ETAs, según estudios realizados en Cuba. La evaluación de muestras de quesos artesanales exponen que el 91,6% de los quesos presentan microorganismos con recuento de 10^6 UFC/g ya sean contaminantes o no, siendo los coliformes totales presentes en aproximadamente el 83 % de los quesos analizados, con recuentos superiores a 10^4 UFC/g (Vasallo, Oca y Cambas, 2016).

Otro estudio realizado en Itapúa (Lezcano, M.T.; Damus, 2012), (mismo departamento en el que se encuentra Coronel Bogado, ciudad donde se obtuvieron las muestras de leche y queso) concuerda con lo anteriormente acotado encontrando la misma prevalencia de coliformes en las muestras de queso pero con un recuento entre $1 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^{10}$. Los elevados índices de coliformes en el queso evaluado es coincidente, e incluso mayores a los reportados por otros trabajos, por lo que estos productos no deberían ser comercializados, ya que según la norma Paraguaya NP 25 053 11 el criterio de aceptación para el consumo resulta ser un valor de 10^4 NMP/100 g.

Varios estudios (Lezcano, M.T.; Damus, 2012; González-Montiel, Lucio; Franco-Fernández y Melitón Jesús, 2015; Vasallo, Oca y Cambas, 2016; Heredia-Castro *et al.*, 2017)

señalan el incumplimiento de las normas microbiológicas aceptables para Buenas Prácticas de Manufactura (Good manufacturing practice GMP o BPM). Durante las diferentes etapas del proceso de elaboración y/o comercialización del producto, ocurre la mayor contaminación del producto al estar en contacto con diferentes materiales contaminantes (utensilios, cuajo, medio ambiente), ya sea por el desconocimiento o las condiciones socio-económicas de los productores, lo que predispone al consumidor de los productos a una mayor probabilidad de consumir patógenos causantes de ETAs.

Los resultados encontrados entre la primera medición de coliformes que fue de 10^{14} en comparación con la segunda medición, en donde se midieron un queso control y un queso al que se le adicionó una carga microbiana de BAL, donde los resultados encontrados fueron de 10^6 la cual permaneció en forma constante durante el tiempo de ensayo. Estas diferencias podrían deberse a un mejoramiento en los procesos de obtención, fabricación y manipulación del queso Paraguayo, además de las condiciones medio ambientales de ese momento que puedan influir.

La utilización del tratamiento térmico en la materia prima, la puesta en práctica de BMP (Buena Prácticas de Manufactura), y la adición de cultivos iniciadores traería consigo el mejoramiento en la calidad microbiológica del queso fresco para su consumo. Si a esto complementamos un tiempo de maduración controlada y estandarizada, podríamos obtener un queso de mejor calidad. Las cepas BAL podrían ser responsables de la disminución de la carga microbiana observada en el primer ensayo en donde los coliformes totales iniciales en el Queso bajaron de 10^{14} a 10^8 en el periodo de un mes, con la consiguiente reducción de los índices de contaminación y la reducción de los riesgos para la salud.

Es por ello que la búsqueda de nuevas cepas BAL salvajes o autóctonas es importante, como lo reportan los diferentes países de Latinoamérica, ya que las mismas aportan mejoras constantes en los alimentos. Sería de mucho valor biotecnológico aislar y realizar diferentes tipos de pruebas a las cepas BAL encontradas en el queso Paraguayo, dado que podrían encontrarse varios tipos de cepas con características poco conocidas. Estas cepas autóctonas dependiendo de las condiciones ambientales, del clima, la humedad, presentan diferentes propiedades y beneficios, como los encontrados en una micro región de Paraíba, Brasil, donde con pequeñas variaciones del microclima, las interacciones entre diferentes BAL difieren en cantidad, como en los aislamientos encontrados (Medeiros *et al.*, 2016). Esta gran variedad permite el desarrollo de características que pueden resultar ser muy beneficiosas para la textura, olores y sabores característicos (Vélez-ruiz, 2016), así como también por sus

capacidades antimicrobianas naturales para inhibir el desarrollo de un patógeno (García González, E.; García Salazar, A.P.; Rojas Dorado, M.C.; Ordoñez–Artunguaga, D. A.; Serna Cock, 2017) o la de potenciar a otras cepas autóctonas como las de los quesos artesanales de Minas, Brasil (Castro *et al.*, 2016). En el presente estudio, en el primer informe, se encontraron cepas de bacterias como el *L. brevis* o el *L. plantarum* que presentan varios beneficios en la industria alimenticia

Debido a la diversidad de especies dentro del género, con similitud fenotípica y fisiológica además de la transferencia horizontal de plásmidos, la identificación taxonómica precisa se hace muy difícil. La manera más fácil y completa para la identificación correcta de la especie, y en la que se basa la mayoría de los investigadores se incluye el conocimiento de las características propias de la especie, el fenotipo, las características fisiológicas agregando comparaciones secuenciales del gen 16S del ARN ribosómico (Singh *et al.*, 2009).

En este estudio, la identificación de las BAL presentes en el queso Paraguay no utilizó métodos tradicionales de microbiología, ya que para la realización de los mismos se necesitaría diferentes medios de cultivos y una inmensa cantidad de baterías de tipificación para llegar a las cepas existentes. La utilización del medio de cultivo MRS presenta en su composición citrato de amonio que es un inhibidor de las bacterias gram negativas, por lo que está ya inhibe muchos de los contaminantes presentes en el queso. Además las BAL presentan una variedad inmensa de especies y sub especies la cual resulta difícil llegar a su identificación exacta.

Una vez obtenidos los resultados emitidos por el Maldi tof se procedió a la comparación por el método de Biología Molecular, obteniendo un informe diferente al esperado, arrojando como posible cepa con un índice de identidad mayor al 99% a la bacteria *G. oxydans*, microorganismo perteneciente al género *Acetobacter*,

Capítulo V



CONCLUSIONES

Se obtuvieron 4 cepas BAL en el queso Paraguay en el primer envío, el cual fue analizado por el método de Maldi tof, de las cuales el género *Lactobacillus* fue el predominante (Fig. 13).

Las cepas BAL se lograron aislar del queso mediante la utilización de un medio de cultivo selectivo, el cual permite solo el desarrollo de bacilos gram positivos, inhibiendo a los microorganismos gram negativos por la presencia en su composición de citrato de amonio.

La cantidad de contaminantes presentes en el queso artesanal hace que este no sea apto microbiológicamente para el consumo en fresco, dados los altos valores de recuento de coliformes que se presentan en toda la región, más aun por la falta de un tiempo de maduración establecido, lo que hace que las BAL no puedan secretar diferentes tipos de metabolitos que puedan actuar sobre los microorganismos contaminantes e inhibirlos. Se observó que a medida que va transcurriendo el tiempo de maduración el recuento de coliformes va disminuyendo paulatinamente, lo que podría ser el inicio de un tiempo de estandarización para la maduración del Queso Paraguay.

Con el transcurrir de la maduración las cepas BAL más aptas, las que desarrollaron hasta el día 30 de maduración, fueron seleccionadas y de las cuales resultaron tipificadas por el método Maldi tof

- *Lactobacillus Brevis*
- *Lactobacillus Plantarum*
- *Weissella confusa*
- *Lactobacillus paralimentarius*

Los resultados del queso control con el queso con la BAL incluidas no mostraron diferencias significativas ya que los recuentos de coliformes fueron los mismos y se mantuvieron durante los 30 días de ensayo. Esta disminución en los recuentos de coliformes podrían deberse a los cuidados o mejoras sanitarias que los productores tuvieron en el momento de la fabricación del queso.

Tras el envío para la confirmación de la cepa de *L. paralimentarius* por medio de la secuenciación del gen de ARNr 16S se comprobó que esta se trataba del *G. oxydans*, por lo que los resultados obtenidos por dos técnicas diferentes no fueron concordantes. Esto explica

la falta de inhibición de los coliformes en el queso con de la cepa “BAL” adicionada respecto al queso control, ya que esta no se trata de un microorganismo con propiedades antimicrobianas.

De hecho, las cepas informadas por el método Maldi tof nos hacen suponer que la flora bacteriana presente en el queso Paraguay es mucho más amplia de lo que podríamos suponer en un principio, dadas las cuatro cepas BAL informadas. La presencia de una Acetobacteria, un bacilo gram negativo nos lleva a pensar la contaminación de la misma antes de la separación del ADN, ya que la cepa fue enviada en medio MRS que supone la inhibición de este tipo de bacterias por el medio de cultivo selectivo utilizado.

De esta manera, el presente trabajo investigativo representa un punto de partida para lograr encontrar el mejor método para tipificar las cepas BAL autóctonas y poder utilizarlas como cultivo iniciadores, mejorando así las condiciones microbiológicas del queso y manteniendo las características organolépticas.

BIBLIOGRAFIA

- Agudelo, N. *et al.* (2015) «Bacteriocinas Producidas Por Bacterias Ácido Lácticas Y Su Aplicación En La Industria De Alimentos», *Alimentos hoy*, 23(36), pp. 63-72. Disponible en: <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/356>.
- Bosch Gallego, M. B. *et al.* (2011) «El consumo del probiótico *Lactobacillus plantarum* CECT 7315/7316 mejora el estado de salud general en personas de edad avanzada», *Nutricion Hospitalaria*, 26(3), pp. 642-645. doi: 10.3305/nh.2011.26.3.5230.
- Cai, Y. *et al.* (1999) «From Sourdough», *International Journal of Systematic Bacteriology*, (1 999), pp. 1451-1455.
- Carr, F. J., Chill, D. y Maida, N. (2002) «The lactic acid bacteria: a literature survey.», *Critical reviews in microbiology*, 28(4), pp. 281-370. doi: 10.1080/1040-840291046759.
- Castro, R. D. *et al.* (2016) «Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons», *Journal of Dairy Science*. United States Food and Drug Administration, Rockville, MD, 99(8), pp. 6086-6096. doi: 10.3168/jds.2015-10579.
- Estrada Maldonado, A. C., Gutiérrez Ramírez, L. A. y Montoya Campuzano, O. I. (2005) «EVALUACIÓN in vitro DEL EFECTO BACTERICIDA DE CEPAS NATIVAS DE *Lactobacillus* sp . CONTRA *Salmonella* sp . y *Escherichia coli*», *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín.*, 58, pp. 2601-2609. Disponible en: [file:///D:/Downloads/21273-72306-2-PB \(1\).pdf](file:///D:/Downloads/21273-72306-2-PB (1).pdf).
- García González, E.; García Salazar, A.P.; Rojas Dorado, M.C.; Ordoñez–Artunguaga, D. A.; Serna Cock, L. (2017) «Formulación mixta de bacterias lácticas para el control de *Listeria monocytogenes* Mixed formulation of lactic bacterium for the control of *Listeria monocytogenes*», *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIX, p. 38–41. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.55879.
- Garde, A. *et al.* (2002) «Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*», *Bioresource Technology*. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00135-3.
- Goldstein, E. J. C., Tyrrell, K. L. y Citron, D. M. (2015) «*Lactobacillus* Species : Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities», 60(Suppl 2), pp. 98-108. doi: 10.1093/cid/civ072.

- González-Montiel, Lucio; Franco-Fernández y Melitón Jesús (2015) «Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña/Microbiological profile of aro cheese consumed in Oaxaca, Mexico», *Brazilian Journal of Food Technology*, 18(3), pp. 250-257. doi: 10.1590/1981-6723.7514.
- Heredia-Castro, P. Y. *et al.* (2017) «Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos», *Interciencia*, 42(6), pp. 340-346.
- Huertas, C., Urbano, E. y Torres, M. (2019) «Diagnostico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos», *Rev haban cienc méd*, 18(3), pp. 513-528. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v18n3/1729-519X-rhcm-18-03-513.pdf>.
- Lezcano, M.T.; Damus, M. E. (2012) «Queso Artesanal en Enc.pdf», *Revista de la Universidad Nacional de Itapua*, p. 65–69.
- Maldonado, N., Robledo, C. y Robledo, J. (2018) «La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica», *Infectio*, 22(1), pp. 35-45. doi: 10.22354/in.v0i0.703.
- Medeiros, R. S. *et al.* (2016) «Identification of lactic acid bacteria isolated from artisanal Coelho cheese produced in the Brazilian Northeast», *CYTA – JOURNAL OF FOOD*, 14(4), pp. 613-620.
- Mondragón Preciado, G. *et al.* (2013) «Bacteriocinas : características y aplicación en alimentos Bacteriocins : characteristic and applications in foods», *Redalyc*, 21, pp. 64-70. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67430113008.pdf>.
- Nguyen, T. D. T., Kang, J. H. y Lee, M. S. (2007) «Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects», *International Journal of Food Microbiology*, 113(3), pp. 358-361. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.015.
- Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I. y Onilude, A. A. (2003a) «Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1», *African Journal of Biotechnology*, 2(8), pp. 219-227. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/AJB>.
- Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I. y Onilude, A. A. (2003b) «Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1», *African Journal of Biotechnology*, 2(7), pp. 179-184. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/AJB>.
- Pang, H. *et al.* (2011) «Reclassification of *Lactobacillus kimchii* and *Lactobacillus bobalius* as

a later subjective synonym of *Lactobacillus paralimentarius*», *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (May), pp. 2383-2387. doi: 10.1099/ij.s.0.035329-0.

Parra Huertas, R. A. (2010) «Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos», *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), pp. 93-105. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>.

Sánchez-valdés, J. J. *et al.* (2016) «Diagnóstico de la calidad sanitaria en las queserías artesanales del municipio de Zacazonapan , Estado de México», 58(4), pp. 461-468.

Serna-Cock, Liliana; Vallejo–Castillo, Vladimir; Garcia–Gonzalez, E. (2012) «Weissella encapsulada en aloe», *Vitae*, 19, p. S168–S170.

Serna-Cock, L. *et al.* (2012) «Weissella confusa como un agente bioprotector en la inocuidad alimentaria contra patógenos Gram negativos», 21(27).

Serna-Cock, L., Angulo-López, J. E. y Ayala-Aponte, Y. A. A. (2015) «Barras de cereal como matriz sólida para la incorporación de microorganismos probióticos», *Informacion Tecnologica*. doi: 10.4067/S0718-07642015000200005.

Shangpliang, H. N. J. *et al.* (2018) «Bacterial community in naturally fermented milk products of Arunachal Pradesh and Sikkim of India analysed by high-throughput amplicon sequencing», *Scientific Reports*. Springer US, 8(1), pp. 6-15. doi: 10.1038/s41598-018-19524-6.

Singh, S. *et al.* (2009) «Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review», *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 42(2), pp. 448-457. doi: 10.1016/j.lwt.2008.05.019.

Vasallo, A. M., Oca, N. M. De y Cambas, A. V. (2016) «Determinación de indicadores sanitarios en quesos artesanales», 38(1), pp. 64-66.

Vélez-ruiz, C. R. J. F. (2016) «Aislamiento , Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra Isolation , Characterization and Selection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria from Goat Milk and Fresh Artisanal-Goat Cheese», *Informacion Tecnologica*, 27(6), pp. 115-128. doi: 10.4067/S0718-07642016000600012.

Vries, M. C. De *et al.* (2006) «*Lactobacillus plantarum* — survival , functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract», *Elsevier*, 16(9), pp. 1018-1028. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.09.003.

Yokoyama, S., Hiramatsu, J.-I. y Hayakawa, K. (2002) «Production of γ -aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005», *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93. doi: 10.1016/S1389-1723(02)80061-5.

ANEXO



Fig. 1: Queso Fresco.



Fig. 2: Queso Maduro (viejo).



Fig. 3a: Cuajo utilizado para coagulación de leche.



Fig 3b: Cuajo conservado en congelación.



Fig. 4: Cuajo comercial.



Fig. 5: Preparación de muestra de queso para recuento de coliformes

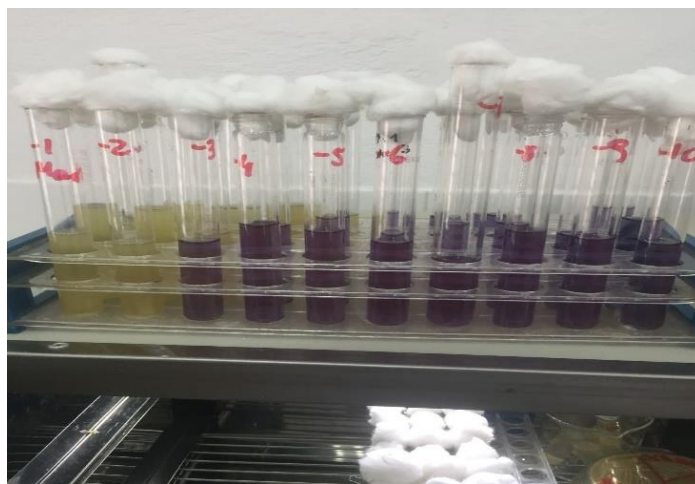


Fig. 6. Diluciones para determinar coliformes totales en leche.



Fig. 7: Queso en medio MRS caldo

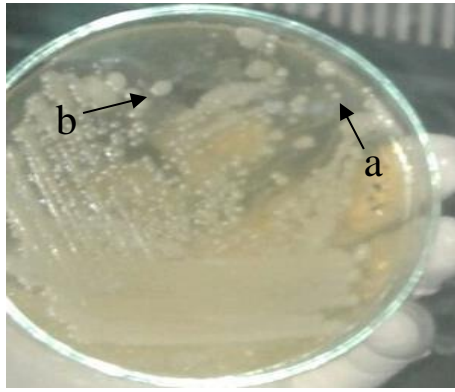


Fig. 8: colonias pequeñas(a) y grandes(b) en MRS.

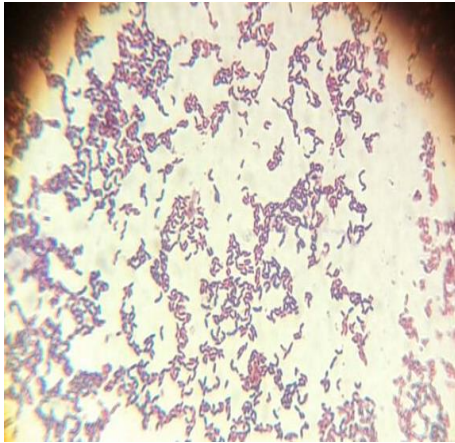



Fig. 9: Obsérvese las Bacterias Gram positiva.




Fig. 10: Cepas enviadas para Maldi tof


DOCUMENTOS COMPLEMENTARIOS

Primer informe de cepas BAL analizadas por el método Maldi tof

NOMBRE: PARRA GONZALEZ, YADIRA ROCIO MEDICO: CENTRO MEDICO LA COSTA SEXO: FEMENINO EDAD: 37 Años PAG. 1	 La Costa Todo en un solo lugar ANALISIS CLINICOS, BACTERIOLOGICOS E INMUNOLOGICOS <small>Avda. Artigas 1600 c/ Concepción Leyes de Chavez. Telf: 217- 1000 www.lacosta.com.py</small>
---	---

ANALISIS	MAT.	RESULTADOS		RANGO DE REFERENCIA	OBSERVACIONES
		DENTRO DE RANGO	FUERA DE RANGO		
(HORA: 13:38) ... MICROBIOLOGIA **CEPA 1 CULTIVO EN AEROBIOISIS **CEPA 2 CULTIVO EN AEROBIOISIS **CEPA 3 CULTIVO EN AEROBIOISIS	• •	Se alisa: -Lactobacillus brevis. Se alisa: -Weissella confusa. Se alisa: -Lactobacillus plantarum.			<div style="text-align: center; font-size: 2em; margin-bottom: 10px;">  </div> Verificado Por: Dra. Carolina Arzamendia Reg. Prof.: 2184 * Fin del Informe
<i>Este resultado es una copia no válida para trámites legales. El original se almacena digitalmente</i>					

Segundo informe de cepas BAL analizadas por el método Maldi tof

NOMBRE: PARRA GONZALEZ, YADIRA ROCIO MEDICO: Médico de Guardia INTERNADOS SEXO: FEMENINO EDAD: 37 Años PAG. 1	 La Costa Todo en un solo lugar ANALISIS CLINICOS, BACTERIOLOGICOS E INMUNOLOGICOS Avda. Artigas 1600 c/ Concepción Leyes de Chavez. Télef.: 217- 1000 www.lacosta.com.py
---	---

ANALISIS	MAT.	RESULTADOS		RANGO DE REFERENCIA	OBSERVACIONES
		DENTRO DE RANGO	FUERA DE RANGO		
(HORA: 16:53) ... MICROBIOLOGIA **Cepa 2 - 15°C CULTIVO EN AEROBIOSIS **Cepa 3 - 15°C CULTIVO EN AEROBIOSIS **Cepa 4 - 37°C CULTIVO EN AEROBIOSIS **Cepa 5 - 37°C CULTIVO EN AEROBIOSIS	• • • •	Se aisló: -Lactobacillus paralimentarius. Se aisló: -Lactobacillus paralimentarius. Se aisló: -Lactobacillus paralimentarius. Se aisló: -Lactobacillus paralimentarius.			
H = HECES O = ORINA S = SANGRE Este resultado es una copia no válida para trámites legales. El original se almacena digitalmente.				e/f Verificado Por: Dra. Carolina Arzamendia Reg. Prof.: 2184 * Fin del Informe	

* NO VÁLIDO PARA PROCEDIMIENTOS LEGALES.

Identificación molecular de un aislado bacteriano mediante el marcador 16S ADNr

INFORME TÉCNICO

Solicitante:

Bqco. Oscar Álvarez

Noviembre de 2018

Lugar de realización

Laboratorio de Biotecnología Molecular (BiotecMol) – Instituto de Biotecnología Misiones (InBioMis) – FCEQyN – Univ. Nacional de Misiones. Ruta 12 km 7 ½. Campus universitario. Localidad: Posadas. Código Postal: 3300
Provincia: Misiones.
Teléfono/Fax: 0376-4480200 int.279 e-mail: biotecmol2010@gmail.com

Objetivo

Realizar la identificación molecular de un aislamiento bacteriano enviado al Laboratorio de Biotecnología Molecular del Instituto de Biotecnología Misiones - InBioMis, mediante extracción de ADN, amplificación de la región 16S y secuenciación de los amplicones.

Responsables técnicos

Dra. María Lorena Castrillo. Licenciada en Genética. FCEQyN. UNaM.

Dr. Gustavo Bich. Licenciado en Genética. FCEQyN. UNaM.

Dr. Pedro Zapata. Bioquímico. FCEQyN. UNaM.

Material de análisis

Tubo N°	Aislamiento
1	Os.1

Metodología

El ADN se extrajo a partir de un cultivo bacteriano puro desarrollado en medio líquido enviado en un tubo de ensayo por el Bqco. Oscar Álvarez. Se utilizó 1.5 mL del caldo y se lo centrifugó a 12.000 rpm durante 3 minutos (Figura 1). Se resuspendió el *pellet* en 600 μ L de Solución TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA), se adicionó 5 μ L de Proteínasa K 20 mg/mL y se agitó en vórtex. Se adicionaron 15 μ L de SDS 20%, y se incubó durante 1 hora a 60°C agitando con vórtex cada 10 minutos. Se añadió un volumen de Fenol saturado en Tris-HCl, se agitó con vórtex por 15 segundos y se centrifugó a 12.000 rpm durante 3 minutos. El ADN fue purificado a partir del sobrenadante de esta digestión utilizando cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó 3 minutos a 12.000 rpm y se transfirió la fase superior (acuosa) a un tubo nuevo. Posteriormente el ADN fue precipitado con isopropanol 100% y 1/10 de Acetato de sodio 3 M pH 7, dejándolo por 24 horas a -20°C. Se centrifugó durante 5 minutos a 12.000 rpm. Se extrajo el alcohol isoamílico y se lavó el *pellet* con 1 mL Etanol 70% frío, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió el ADN en agua destilada libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.



Figura 1: Cultivo líquido concentrado del aislado Os.1 previo al proceso de extracción de ácidos nucleicos.

Para realizar la identificación molecular del aislado bacteriano enviado se amplificó la región del gen 16S del ADN ribosómico utilizando los cebadores 27f y 1945r (Picard et al., 2008). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 20 μ L, conteniendo agua libre de nucleasas, *buffer* 1 X [10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl], 3 mM de MgCl₂, 200 μ M de desoxinucleósidos trifosfato (INBIO, Argentina), 10 picomol de cada uno los cebadores y 0,75 U de Taq ADN polimerasa (INBIO, Argentina). A cada tubo de reacción se agregaron 5-20 ng del ADN genómico extraído. Se utilizó un ciclado compuesto por una desnaturalización inicial durante 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, 70 segundos a 54°C, 65 segundos a 72°C, y una elongación final durante 10 minutos a 72°C.

Los productos de amplificación por PCR fueron evaluados en geles de agarosa al 2%, y posteriormente purificados y secuenciados utilizando el servicio de Macrogen Korea. Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa *Geneious* 9.1.5 que permite la visualización de los cromatogramas, facilita su control y la conformación de una secuencia cónfigo consenso para el par de secuencias obtenidas. Las secuencias fueron contrastadas contra las bases de datos de *RDP* (<https://rdp.cme.msu.edu/>) y la base de datos del *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando la herramienta *BLASTn*.

Cebadores utilizados (Picard et al., 2008)

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Tm</i>	<i>Longitud</i>
<i>27F (S)</i>	<i>5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'</i>	<i>54</i>	<i>21</i>
<i>1495R (As)</i>	<i>5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA -3'</i>	<i>54</i>	<i>20</i>

S: sentido; As: Antisentido.

Resultados

De acuerdo a la metodología empleada fue posible extraer ácidos nucleicos del aislado bacteriano codificado como Os.1. En la Figura 2 se presenta la foto de la evaluación de extracción de los ácidos nucleicos extraídos de este aislamiento.

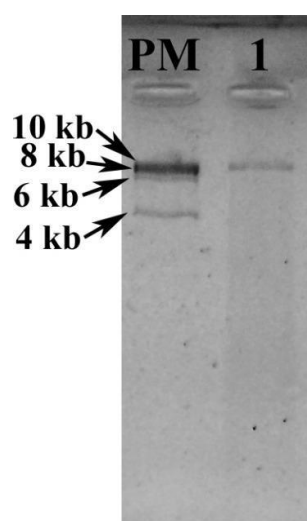


Figura 2: Gel de agarosa al 1% para corroborar la extracción de ADN. PM: peso molecular.

Una vez obtenido los ácidos nucleicos del aislado, se logró amplificar la región 16S del ADN ribosómico. En la Figura 3 se presentan los productos de amplificación por PCR a partir del ADN extraído. Se observó un amplicón de aproximadamente 1400 pb correspondiente a la región analizada.

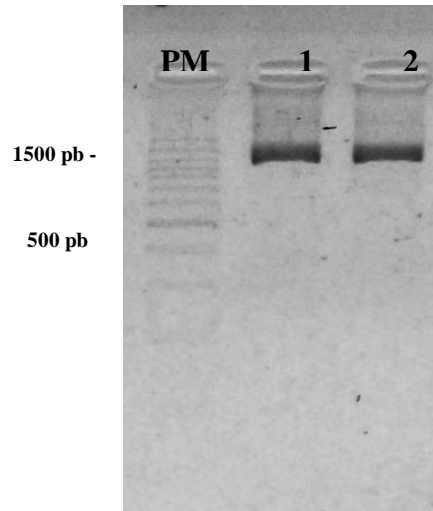


Figura 3: Gel de agarosa al 2% para visualización de los productos de PCR. Carril 1 y 2: Amplificación por PCR de la región 16S ADNr del aislado Os.1 por duplicado. PM: peso molecular.

Los productos de amplificación por PCR fueron enviados a purificar y secuenciar a Seoul (Korea) por los servicios de Macrogen. Luego de su procesamiento y evaluación, las secuencias obtenidas del aislado Os.1 (*forward*, *reverse* y la secuencia consenso generada a partir de ellas) presentaron elevados índices de identidad, mayores al 99%, con secuencias reportadas de *Gluconobacter oxydans*, tanto en la base de datos RDP como en la base de datos del NCBI.

La Tabla 1 presenta los resultados obtenidos luego del contraste de las secuencias en la base de datos RDP y NCBI.

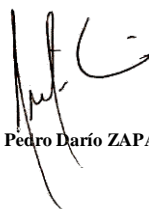
En el anexo A se adjuntan las secuencias obtenidas, editadas y analizadas empleadas en la identificación del aislado bacteriano.

Tabla N°1: Análisis molecular y bioinformático del aislado bacteriano.

Aislado	Resultados del análisis mediante PCR – Secuenciación			Nombre científico final
	Secuencia en Análisis	Mediante base de datos primaria NCBI	Mediante base de datos curada RDP	
Os.1	16S forward	<i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
	16S reverse	<i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>	
	Cóntigo Consenso	<i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>	

Conclusión

El análisis de identificación molecular de la región 16S del ADN ribosómico y el análisis bioinformático en las bases de datos moleculares permitieron designar al aislado bacteriano codificado como Os.1 como perteneciente a la especie *Gluconobacter oxydans*.



Dr. Pedro Darío ZAPATA

Doctor por la UAH - Bioquímico MP 354

ANEXO A: Secuencias nucleotídicas en formato FASTA

>Os.1-16S-forward

GGTTTCGGCCTTAGTGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGGATCTATCCACGGGTGG
GGGACAACTTCGGGAAACTGGAGCTAATACCGCAGATACCTGAGGGTCAAAGGCGC
ACGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTAC
CAAGGCGATGATCGATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAG
CCTGATCCAACAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGA
CGGGGACGATGATGACGGTACCCGTATAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGC
GTAGGCGGTTGTTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATT
GATACGTGACGACTAGAGTTCGAGAGAGGGTTGTGGAATCCCAGTGTAGAGGTGAA
ATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCTGCAACCTGGCTCGATACTG
ACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTATATACCCTGGTAGTCCACG
CTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTG

>Os.1-16S-reverse

GGCTTAGGGTTCGAACCAACTCCCAGGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGG
AACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCACCTTCATGTA
GAGTTGCAGAGTACAATCCGAACTGAGACGGCTTTTAGAGATCAGCATGATGTCACC
ATCTAGCTTCCCCTGTACCCGCCCTTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGACATAAGGGC
CATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGCTTGTACCCGGCAGTCTCTCTGA
GTGCCACCTGAAAGTGCTGGCAACTAAAGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT
AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGCGGGAGGT
CCGAAGAAAGGTCCATCTCTGAACCGGTCCTCCCCATGCAAGCCCTGGTAAGGTTCTG
CGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCT
TTGAGTTTCAACCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGTGTGCTTAACGCGTTAGCTTCG
ACACTGAAAACTAAGTTTCCCAACATCCAGCACACATCGTTTACAGCGTGGACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCGCCTCAACGTCAGTATCGAGCCA
GGTTGCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAATATCTACAAATTCACCTCTACACTG
GGAATTCACAACCTCTCTCGAACTCTAGTCGTCACGTATCAAATGCAGTTCCCAGG
TTAAGCCCCGGGATTCACATCTGACTGTAACAACCGCCTACGCGCCCTTACGCCCA
GTCAT

>Os.1-16S-Cóntigo consenso

GGTTTCGGCCTTAGTGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGGATCTATCCACGGGTGG
GGGACAACTTCGGGAAACTGGAGCTAATACCGCAGATACCTGAGGGTCAAAGGCGC
ACGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTAC
CAAGGCGATGATCGATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAG
CCTGATCCAACAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGA
CGGGGACGATGATGACGGTACCCGTATAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGC
GTAGGCGGTTGTTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATT
GATACGTGACGACTAGAGTTCGAGAGAGGGTTGTGGAATTCAGTGTAGAGGTGAA
ATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCGATACTG
ACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGAAACTTAGTTTTTCAGTGTGAAGCTAAC
GCGTTAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAAC
CTTACCAGGGCTTGTCATGGGGAGGACCGGTTGAGAGATGGACCTTTCTTCGGACCTCC
CGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCAGCACTTTCAGGTGGGCACTCAAGAGA
GACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTT
ATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAAGGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGATGGTGA
CATCATGCTGATCTCTAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTAC
ATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCCCTGGGAGTTGGTTCGACCCTAAGCC