

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE BACTERIAS LÁCTICAS HALOTOLERANTES DE QUESO DOBLE CREMA

M.C. Fredy Morales; Dr. Humberto Hernández; Dr. César Hernández. ENCB-IPN. Prol. de Carpio S/N; México, D.F. C.P. 11340. Fax: 57296000 ext. 62463. fredymt@hotmail.com

Aislamiento, queso, halotolerante.

Introducción. Recientemente se descubrió la presencia de un grupo de BALHA (bacterias ácido-lácticas halofílicas o halotolerantes), posiblemente de origen marino, en la corteza de algunos quesos madurados europeos, dando lugar a una serie de investigaciones para tratar de averiguar el posible papel de estos microorganismos en esos quesos. En estos estudios se han usado métodos de cultivo y moleculares para cuantificarlos e identificarlos (1). Los medios salinos para la cuantificación o aislamiento de las LAB, no se habían aplicados previamente al análisis de la flora microbiana en los quesos.

Este trabajo tiene como objetivo aislar y caracterizar parcialmente las BALHA presentes en el queso doble crema de Chiapas, con posible importancia en el proceso de maduración.

Metodología. Se determinó la humedad, a_w , pH y concentración de NaCl de un queso comercial. Se prepararon alícuotas de la muestra y se inocularon en medios de cultivo MRS y GYPC, a 5 y 7% de NaCl para realizar el aislamiento, incubándolos 48h a 30°C. Las colonias aisladas se resembraron individualmente y se observaron microscópicamente mediante tinción de Gram. A los morfotipos diferentes se les extrajo su DNA genómico (2) y se desarrollaron PCR-RAPD's como pruebas de tamiz en la identificación, utilizando el iniciador OPE-18 (5'-GGACTGCAGA-3'), después de la cual se llevó a cabo la electroforesis de los productos en gel de agarosa al 2.5%. Posteriormente a las cepas aisladas y elegidas se les amplificó el gen 16S rRNA mediante PCR; se emplearon los iniciadores: Derecho 8 (5' GCGG ATCC GCGG CCGC TGCA GAGT TTGA TCCT GGCT CAG 3') e Inverso 1492 (5' GGCT CGAG CGGC CGCC CGGG TTAC CTTG TTAC GACT T 3'). Los productos de PCR se purificaron y se confirmó la presencia de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se realizó la secuenciación de los amplicones y se identificaron las especies aisladas mediante el empleo de los programas BLAST 2.2.3 del GenBank, BioEdit 7.0.9.0, SeaView 3.2, ClustalX 2.0.10 y Mega 4.0.2.

Resultados y discusión. En el Cuadro 1 se presentan las características del queso doble crema, con las cuales es posible establecer como hipótesis la posible presencia de BALHA. Mediante observación microscópica se

realizó una primera clasificación de las colonias aisladas (Fig. 1).

Cuadro 1. Características del queso doble crema

Humedad	48.2%
a_w	0.972
pH	4.027
NaCl	5.34%



Fig. 1. Morfotipos diferentes de los aislados

Se extrajo el DNA de los aislados, y mediante PCR-RAPD fue posible formar grupos de cepas que presentaban patrones en las bandas similares (Fig. 2).

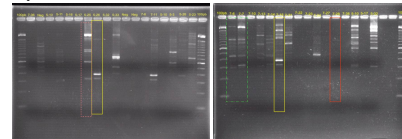


Fig. 2. Perfiles de RAPD de los aislados

Posteriormente se realizó la PCR de las cepas elegidas, así como su purificación, secuenciación y análisis de las secuencias para su identificación. Las especies de BALHA presentes en el queso doble crema se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Especies de BALHA en el queso doble crema

<i>Lactobacillus acidipiscis</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>

Conclusiones. Dada la alta concentración de NaCl en el queso doble crema, es posible inferir que existan BALHA que tengan un papel importante en la maduración.

Se presentó heterogeneidad morfológica de las cepas aisladas en ambos medios de cultivo, que mediante técnicas moleculares permitió la identificación taxonómica de estas especies.

Bibliografía.

- Ishikawa, M; Kodama, K.; Yasuda, H.; Okamoto-Kainuma, A.; Koizumi, K. & Yamasato, K. (2006). Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. *J Appl Microbiol.* 44: 308-313.
- Hoffman, C. & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 57(2-3): 267-72).