



IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS AISLADOS DEL QUESO COTIJA Y DE SUS MATERIAS PRIMAS

Thania Robles, Carolina Peña y Maricarmen Quirasco. Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. Química.
Depto. Alimentos y Biotecnología, Ciudad Universitaria, 04510, D.F. México.
quirabma@unam.mx, Tel. (55) 5622-5305.

Palabras clave: Identificación por ADNr 16S, bacterias queso Cotija, lipólisis, proteólisis.

Introducción. El Queso Cotija Región de Origen es un producto artesanal, madurado, salado, de pasta dura, no cocida. Anteriormente en el grupo de trabajo se aislaron diversos microorganismos del queso Cotija artesanal y de sus materias primas (leche y sal de mar). Algunos se identificaron a nivel género pero no especie y otros estaban sin identificar.

Con base en lo anterior el objetivo general del presente trabajo fue identificar la colección de microorganismos aislados del queso Cotija y de sus materias primas mediante la secuenciación completa del gen ribosomal 16S. Además, se evaluó cualitativamente la actividad proteolítica y lipolítica de cada microorganismo.

Metodología. Se trabajó con una colección de 43 microorganismos que ya se habían aislado del queso Cotija y de sus materias primas. Una vez confirmada la pureza del cultivo, cada cepa se sembró en agar tributirina (AT) (1% tributirina) y en agar leche descremada (ALD) (1.5% leche descremada) para la detección de actividad lipolítica y proteolítica, respectivamente. Se evaluó cualitativamente la capacidad enzimática de las cepas, midiendo la relación diámetro halo/diámetro colonia. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN con el kit Fast ID Genomic DNA Extraction Kit. Posteriormente se amplificó del gen ribosomal 16S con los cebadores universales fD1 y rD1 (1). Los amplicones se secuenciaron y los resultados se compararon mediante un BLAST contra la base de datos del Ribosomal Database Project (RDP) (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) y del GenBank (NCBI). Se comprobó su identidad mediante un análisis filogenético utilizando el método de Neighbor-Joining con bootstrap de 10,000 remuestreos.

Resultados. De las cepas que ya estaban identificadas por el análisis de la secuencia de la región V3 del ADNr 16S, un 90% coincidieron con la identidad determinada en este trabajo (ADNr 16S completo). Se detectaron dos casos donde se había hecho una identificación errónea a nivel de especie. Por ejemplo, una cepa de *Enterococcus* se había identificado como *E. faecalis*, y al considerar la secuencia completa del ADNr 16S, resultó ser de la especie *faecium*. Adicionalmente, se identificaron bacterias no descritas previamente en el queso Cotija y sus materias primas, por ejemplo: dos especies del género *Staphylococcus*: *S. warneri* y *S. cohnii*; dentro de las γ -proteobacterias: *Acinetobacter lwoffii*, *Klebsiella*

oxytoca y *Enterobacter* sp.; del género *Bacillus* se identificó a *B. marisflavi*; en los actinomicetales: *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Brevibacterium epidermidis*, *Kocuria rhizophila* y *Kocuria marina*. Particularmente, aislados de la sal, se encontraron a *Bacillus marisflavi*, *Bacillus flexus*, *Aerococcus viridans* y *Staphylococcus cohnii*.

Se analizó la actividad enzimática proteolítica y lipolítica de todas las cepas. Resaltaron por su actividad lipolítica (Fig. 1A): *E. faecium*, *S. warneri*, *Staphylococcus xylosus* y sobre todo *Kocuria rhizophila*. Dentro de las bacterias que presentaron mayor actividad proteolítica (Fig. 1B) tenemos a *Bacillus marisflavi*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter lwoffii*, *Kocuria rhizophila* y *Kocuria marina* en orden ascendente de proteólisis producida en ALD. Respecto a las bacterias con ambas actividades enzimáticas se encontraron *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus xylosus*, *Kocuria rhizophila* y *Kocuria marina*.

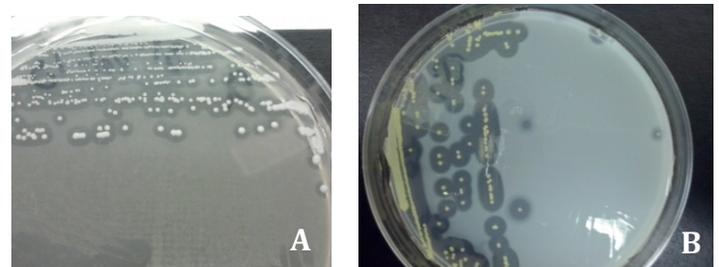


Fig. 1. A. Actividad lipolítica de *E. faecium* en AT. B. Actividad proteolítica de *Kocuria rhizophila* en ALD.

Conclusiones. Se obtuvo un mayor porcentaje de identidad al utilizar la secuenciación completa del gen ribosomal 16S a comparación de cuando se usó sólo la región V3. Al utilizar dos bases de datos diferentes NCBI y RDP para comparar las secuencias problema, se pudo obtener una identidad más certera de los microorganismos aislados. Se identificaron algunas bacterias con actividad enzimática lipolítica y proteolítica de posible aplicación en alimentos.

Agradecimiento. PAPIIT IN218613, DGAPA-UNAM.

Bibliografía.

1. Weisburg, W., Barns S., Pelletier D. y Lane D. (1991). *J Bacteriol* 173: 697-703.