

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DESCRIPCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA
COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN EL
COTIJA POR MÉTODOS MOLECULARES”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
Q.A. ALMA BERENICE ZÚÑIGA BUSTOS**

Tutora: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente:	Dra. Gloria Soberón Chávez.
Vocal:	Dra. Ma. Esperanza Martínez Romero.
Secretario:	Dr. José Adelfo Escalante Lozada.
1er. Suplente:	Dr. Francisco Ruiz Terán.
2do. Suplente:	Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte.

Sitio donde se desarrolló el tema:

El proyecto de tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch en el Laboratorio 312, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

Este trabajo de investigación recibió apoyo del proyecto PAPIIT IN200705 "Caracterización de la microbiota presente en quesos tradicionales mexicanos".

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada.

RECONOCIMIENTOS

Durante la realización del proyecto, reconozco y agradezco la colaboración de estas excepcionales personas:

A la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch, por su amistad, confianza, paciencia, orientación y apoyo, mil gracias.

A los integrantes de mi comité tutorial; el Dr. Francisco Ruiz Terán y el Dr. Mariano García Garibay, así como a la Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte, por su valiosa opinión, consejo e instrucción, Gracias.

A la M. en C. Sandra Bolaños Núñez por haber compartido su experiencia en lo que se refiere al DGGE, Gracias.

A la M. en C. Carolina Peña Montes y M. en C. Denise Castro Ochoa por su orientación en la realización de la clonación, Gracias.

A la M. en C. Laura Espinosa Asuar por su orientación en la realización del análisis de las secuencias, Gracias.

A la M. en C. Idalia Ma. Antonieta Flores Arguello, por facilitar la disponibilidad, uso y mantenimiento de los equipos de laboratorio.

A la pas de Q.A. Linda Cortés y a la Q.A. Amanda Bravo por su dedicación en el aislamiento y purificación de los aislados empleados como patrón de migración, Gracias.

DEDICATORIAS

Todo comenzó con un desafío, una ilusión, el deseo de aprender y crecer. Hoy que he materializado el sueño, agradezco y dedico mi esfuerzo:

A DIOS, por hacerme sentir que esta siempre conmigo.

A la UNAM mi *alma mater*, por permitirme realizar en tus aulas, bibliotecas, áreas deportivas y recreativas, mis más grandes sueños y conocer a las personas de gran trascendencia en mi vida.

A mis padres y hermanos, por su cariño y amistad.

A mis abuelos, tíos y primos, por su confianza y apoyo.

A mi bichito, Jorge Dircio Segura, por su compañía y amor.

A mis amigos de toda la vida

A mis amigos del laboratorio 312, Abraham, Aide, Dra. Amanda, Amandita, Dra. Ame, Ángeles, Armando Carmen, Caro, Cindy, Denise, Florencia, Gaby, Idalia, Israel, Katy, Linda, Dra. Maricarmen, Mario, Mirna, Nayeli, Norma, Paloma, Paty, Raúl, Sr. Rodrigo, Vane, Verito y Vero, por su aprecio, sonrisas, convivencia y solidaridad. Gracias.

Gracias a todos ustedes por propiciar o participar en los instantes mágicos de mi vida, esos momentos en el que un sí o un no cambiaron mi existencia.

CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCIÓN.	3
1. El queso Cotija.	3
2. Reconocimiento del auténtico queso COTIJA.	3
<u>Descripción del proceso.</u>	6
<u>Especificaciones de la materia prima y producto terminado.</u>	7
<u>Recomendaciones de buenas prácticas de manufactura y equipo.</u>	8
<u>Comercialización.</u>	8
3. Componentes elementales de la maduración (CEM).	9
4. Microbiota colonizadora típica en los quesos madurados de elaboración artesanal.	11
5. Diferenciación sensorial del auténtico queso Cotija.	13
6. Estudio de la diversidad microbiana mediante el análisis de secuencias conservadas ADNr 16S.	15
7. Descripción de la técnica PCR-DGGE.	18
8. PCR-DGGE en el estudio de comunidades bacterianas en quesos madurados.	21
9. El papel de los <i>Enterococcus</i> en alimentos fermentados.	24
III. JUSTIFICACIÓN.	29
IV. HIPÓTESIS.	30
V. OBJETIVOS.	31
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	32
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.	33
1. Descripción de las muestras.	33
2. Método de extracción del ADN.	34
3. Amplificación de la región V3 del ADNr 16S.	36
4. DGGE – perpendicular.	39
5. DGGE-paralelo.	39
6. Tratamiento de las bandas escindidas del gel para secuenciación.	40
7. Clonación, como método alternativo de separación.	41
8. Patrones de migración.	45
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	48
RETO 1: Obtener ADN de la microbiota colonizadora directamente del alimento, para la amplificación de la región V3 del gene ADNr 16S.	48
RETO 2: Determinar el gradiente desnaturalizante óptimo para separar los amplicones.	52
RETO 3: Obtener la huella génica para A1, A2, NoA, cuajada y chiapas.	55

OBJETIVO 1: Análisis global de las poblaciones bacterianas.	60
<u>Diversidad bacteriana.</u>	60
<u>Dinámica bacteriana.</u>	62
<u>Dominancia relativa.</u>	64
<u>Descripción integral de la población bacteriana en el queso Cotija.</u>	70
OBJETIVO 2: ¿Es posible diferenciar al auténtico queso Cotija por su población bacteriana?	72
<u>Posibilidad de diferenciación por individuo.</u>	75
OBJETIVO 3: Clasificación dentro de un género de las bacterias distintivas del auténtico queso Cotija.	76
<u>Mediante la comparación con patrones de migración.</u>	76
<u>Secuenciación del producto de PCR separado por DGGE.</u>	85
<u>Secuenciación del inserto separado por clonación.</u>	90
<u>Prueba de confiabilidad de la clasificación de las bacterias distintivas.</u>	97
<u>Descripción del comportamiento de las bacterias distintivas.</u>	102
IX. CONCLUSIONES.	104
X. RECOMENDACIONES.	105
XI. REFERENCIAS.	106
XII. ANEXOS.	117
ANEXO I. Variantes del método de extracción de ADN directamente del alimento.	117
ANEXO II. Equipo y soluciones empleadas en el DGGE perpendicular y paralelo.	120
ANEXO III. Secuencias de la región V3 del ADNr 16S.	123

I. RESUMEN

Introducción. El Cotija es un queso madurado, que se elabora artesanalmente a partir de leche cruda de vaca, contiene un elevado contenido de sal y un sabor-aroma muy pronunciado. Éste depende principalmente de la microbiota colonizadora, hasta ahora inexplorada, por lo que resulta importante conocer a los individuos que la conforman. Su calidad, tradición y autenticidad son resguardadas por la asociación pro-sierra de JalMich bajo la marca colectiva queso Cotija región de origen (IMPI; 867585 y 86); sin embargo, existen productos en el mercado que se denominan Cotija sin ser auténticos. **Objetivo.** Realizar un análisis global, que permita conocer la diversidad, dinámica, dominancia relativa e identidad de la comunidad bacteriana presentes en el queso Cotija auténtico, enfocándose en la identidad de algunas de las bacterias distintivas que lo pudieran distinguir de los no auténticos, utilizando técnicas de microbiología tradicional que complementan a los métodos independientes de cultivo. **Metodología.** El estudio se hizo en tres muestras de queso Cotija, dos auténticas (A1, A2) y una no auténtica (NoA), durante los primeros 7 meses de su maduración. El PCR-DGGE incluye las siguientes etapas: (I) Extracción del ADN total directamente del alimento, (II) Amplificación de la región V3 del gene ADNr 16S, utilizando cebadores universales para bacterias, (III) Separación de los productos de PCR en un Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE), conocido como huella génica, donde cada banda representaría una bacteria diferente, (IV) Identificación de algunas bandas en el gel, por comparación con patrones de migración de bacterias aisladas de las muestras en estudio, mediante secuenciación del amplicón separado por DGGE y/o por secuenciación del amplicón separado por clonación, con la posterior comparación de las secuencias (BLAST). Los gels fueron digitalizados y analizados mediante el software Quantity One y Diversity Data Base, respectivamente. **Resultados y discusión.** La comunidad bacteriana de las muestras A1, A2 y NoA, está representada por 25, 15 y 21 bandas o individuos, respectivamente, los cuales en el análisis global por PCR-DGGE, muestran en cuanto a **diversidad** tres tipos de comunidades colonizadoras, distinguidas por su comportamiento ante los cambios graduales de su microambiente como, *sin alteración*: porcentaje mayoritario 80, 74 y 86 en A1, A2 y NoA, respectivamente; *inhibidos*: presentes sólo en A1 y NoA; y *favorecidos*: presente en A2 y NoA. En la **dinámica del desarrollo** bacteriano se observan dos tipos: una *población variable* que se detectó sólo en alguna etapa de la maduración y la *población constante*, que corresponde a la mayoría de los individuos: 84, 73 y 86% en A1, A2 y NoA, respectivamente. Esta última población estuvo presente desde el inicio de la maduración y fue capaz de sobrevivir en concentraciones elevadas de sal (4-7.4%) y a_w

bajo (0.9-0.86), condiciones prevalecientes en el producto hasta el final de la maduración aproximadamente 7 meses. Como caso particular para A1, donde se estudio la cuajada, se observó que las etapas de salado y oreado contribuyeron con el 52% de la población. En lo que respecta a la población **dominante relativa**, ésta representa el 44, 33 y 48% en A1, A2 y NoA, respectivamente. Las bacterias distintivas se clasificaron como: *Enterococcus faecium* UC824, *Enterococcus faecalis* N1-33, *Vagococcus* sp., *Enterococcus faecium* IDCC2104 y *Marinilactibacillus* sp. con porcentajes de identidad e intervalos de confianza de 100/70; 100/99; 100-98/93; 100/70; y 97-96/91; respectivamente. **Conclusiones.** El método de extracción y purificación de ADN directamente del queso Cotija implementado durante este trabajo, permitió obtenerlo en cantidad y calidad suficiente para la realización de la PCR. En la huella génica de las muestras A1, A2 y NoA, se observó una gran complejidad lo que aunado a la microheterogeneidad y co-migración dificultó el análisis e identificación de cada individuo de la población bacteriana. Los resultados del análisis global de la diversidad, dinámica y dominancia relativa de las poblaciones bacterianas, sugieren que las operaciones posteriores a la obtención de la cuajada contribuyen ampliamente en la cantidad y diversidad de la microbiota colonizadora. Los métodos dependientes de cultivo, permitieron aislar BAL's pertenecientes al género *Enterococcus*. Por métodos independientes de cultivo se identificaron microorganismos pertenecientes al grupo de bacterias lácticas que se han encontrado en otros productos lácteos tradicionales de fermentación espontánea. Tal es el caso de *Enterococcus* y *Marinilactibacillus*. La secuenciación de la región V3 del ADNr 16S permitió identificar especies de *Enterococcus*, y a los géneros *Vagococcus* y *Marinilactibacillus*. Las especies de *Enterococcus* identificadas no fueron población dominante. Sin embargo estuvieron presentes y se mantuvieron durante el periodo analizado del proceso de maduración. El género *Marinilactibacillus* fue dominante durante el periodo de maduración estudiado. El género *Vagococcus* estuvo presente en el periodo de maduración estudiado y su dominancia fue dependiente del microambiente en que se desarrolló.

II. INTRODUCCIÓN.

1. El queso Cotija.

El queso Cotija es sin duda el queso mexicano genuino más conocido y de mayor tradición, tuvo su origen en el estado de Michoacán y Jalisco hace ya varios siglos, de donde pasó a otras regiones de la república, como los estados de Chiapas y Tabasco, principalmente.

El Cotija se clasifica como un queso madurado, de pasta dura y de gran formato con un peso que oscila de los 20-30 kg, posee una pasta friable (desmoronable, adecuada para rallar), ácida y con un porcentaje elevado de sal (aprox. 6%), cuando está bien maduro presenta un color blanco amarillento agradable y un sabor-aroma bastante pronunciado, cabe destacar que se elabora con leche cruda de vaca (Villegas, 2004).

2. Reconocimiento del auténtico queso Cotija.

Debido a que existen productos en el mercado que se denominan Cotija sin ser auténticos, un grupo de productores formaron la asociación regional pro-sierra de JalMich, quienes bajo la figura legal de Sociedad de Producción Rural (SPR-RI), el 7 de marzo del 2005 obtuvieron del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) la marca colectiva del queso Cotija región de origen bajo los números 867585 y 867586 (Fig. 1), con lo cual ganaron una ventaja competitiva en el mercado y un sobreprecio del producto, justificado por la garantía de calidad, tradición y autenticidad, factores que desde hace más de cuatro siglos le han dado el reconocimiento en todo el país y en el mundo (Barajas *et al.*, 2005; La Jornada, 2006).



Figura 1. Logotipo que identifica a la marca colectiva del queso Cotija región de origen (Barajas *et al.*, 2005).

La marca reconoce como regiones auténticas de producción a los municipios (Tabla I) ubicados en la intersección del bosque y la selva baja entre el estado de Jalisco y Michoacán los cuales forman una herradura (Figura 2).

Tabla I. Municipios que conforman la asociación regional pro-sierra de JalMich.	
ESTADO	MUNICIPIOS
JALISCO	Sta. Ma. del Oro
	Jilotlán de los Dolores
	Quitupan
MICHOACÁN	Cotija
	Tocumbo
	Buena Vista



Figura 2. Sierra de JalMich. Región de origen del queso Cotija (Barajas *et al.*, 2005).

Para cumplir con las garantías de calidad y autenticidad los productores se comprometieron a seguir lo establecido en las “Reglas de uso de la marca colectiva región de origen” (Barajas *et al.*, 2005) (Fig. 3), que describe someramente el proceso de elaboración, las especificaciones de la materia prima y producto terminado, las recomendaciones de buenas prácticas de manufactura y equipo, así como las formas de comercialización.

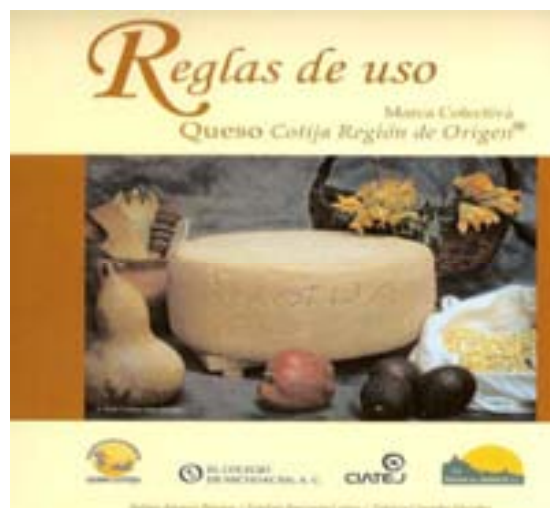


Figura 3. Portada del Manual “Reglas de uso de la marca colectiva región de origen” (Barajas *et al.*, 2005).

Descripción del proceso.

El proceso de elaboración del auténtico Cotija (Fig. 4) consta de 9 etapas principales, (1) la leche que se utiliza en la elaboración del queso será la obtenida de la **ordeña** del día, (2) la leche se deja reposar en un recipiente, una vez que alcanza la temperatura óptima para ser cuajada, aprox. 25°C, se **adiciona el cuajo** mezclando rápidamente, pudiendo acompañarse de una parte de la sal total añadida, según la costumbre. De acuerdo a lo que se pudo observar en una visita de campo, el cuajo de origen microbiano (CUAMEX) se dosifica con una jeringa en una proporción de 10 mL/100 L de leche, (3) la consistencia de la cuajada se prueba cruzándola con una cuchara o cuchillo y una vez alcanzado el punto deseado, aproximadamente 2 horas después, se **corta** hasta obtener grumos equivalentes en tamaño a un grano de maíz, (4) la cuajada cortada se **desuera** por **drenado**, seguido del **manteado** operación que consiste en pasar la cuajada por un cedazo limpio y se exprime. El **salado** (5) se realiza amasando la cuajada manualmente incorporando la sal; de acuerdo a lo observado, se agregan 7.5 g/L de leche, aunque esta cantidad puede variar, (6) la masa salada se puede **moldear** o dejar reposar sobre una mesa, para que al día siguiente se incorpore una cantidad equivalente del primer amasado y así tener la cantidad suficiente para llenar el aro (cincho, cinturón o fajo del diámetro específico del producto) cubierto en su interior con dos bandas de ixtle (fibra de maguey) con las que se envolverá la masa, éstas confieren en conjunto la forma y el volumen de la pasta, que a su vez habrá de dar lugar a las piezas con la presentación tradicional cilíndrica de alrededor de 20 kilogramos, (7) la pasta así fajada se **prensa** de 18 a 24 horas, según lo observado, se utiliza una piedra rectangular de aproximadamente 80 kilos, (8) la pasta prensada se faja y se desfaja operación conocida como **oreado** diariamente durante 15 días o hasta que la pieza adquiera la firmeza necesaria para ser manipulada, (9) el queso se limpia y se voltea diariamente alternando la cara expuesta al aire durante los tres primeros meses de la **maduración**.



Figura 4. Diagrama de producción tradicional del queso Cotija región de origen.

Especificaciones de la materia prima y producto terminado.

La leche debe proceder de vacas criollas (mezcla de raza cebú y europea) sanas, libres de *Brucella* y tuberculosis, con un contenido mínimo de 3.7% de grasa y 3% de proteína. Cabe señalar que el ganado, durante la producción del queso en los meses de junio a noviembre, deberá alimentarse únicamente de zacate de sabana y ramoneo, hierbas así llamadas por los productores, que crece en las praderas naturales localizadas en la región que protege la marca, dejando de lado los alimentos balanceados o concentrados.

Aunque se utiliza cuajo de origen microbiano, a partir de la obtención de la marca colectiva Región de Origen, los productores se comprometieron a usar cuajo natural, elaborado higiénicamente por los mismos productores de queso, a partir del cuajo de rumiantes jóvenes; o en su defecto, cuajo comercial de origen animal.

La sal debe ser de mar (de grano), libre de materia extraña y compuestos químicos, obtenida mediante proceso artesanal para que tenga la consistencia necesaria para su incorporación durante el salado.

En cuanto a la composición del producto terminado, el Cotija deberá tener 23% mín. de grasa, 25% mín. de proteína y una humedad máx. de 36% (Barajas *et al.*, 2005).

Recomendaciones de buenas prácticas de manufactura y equipo.

En cuanto a las buenas prácticas de manufactura se recomienda que la persona que ordeñe conserve las manos limpias por lo que una segunda persona deberá limpiar los pezones de la vaca, además el ordeñador evitará tocar otras partes del animal, la leche bronca se pasará por cedazos limpios para retener cualquier materia extraña, antes de su utilización, se debe usar un trapo limpio y suave que no desprenda hilos o materia extraña que pueda poner en riesgo la calidad del queso al limpiar la superficie durante la maduración.

El equipo empleado como son tinajas, mesas, anaqueles, fajas y recipientes deberán ser de acero inoxidable y se mantendrán limpios, alejados de contaminaciones y fuera del alcance de insectos, aves, plagas u otros animales (Barajas *et al.*, 2005).

Comercialización.

En el mercado el Cotija se conoce como añejo cuando su tiempo de maduración va de los 3 a 6 meses o rendido cuando va de 6 a 12 meses, es importante resaltar que el tiempo mínimo de maduración antes de su venta debe ser de 100 días de vida y que ésta debe ocurrir dentro del área geográfica protegida por la marca, lo que asegura las condiciones de maduración: temperatura media entre 20-25°C, humedad relativa de 80 a 90% propia de una precipitación pluvial media anual (ppma) de 900-1200 mm y una altura entre los 700 y 1700 msnm. Se considera como el inicio de vida del queso a partir del retiro de la prensa (Barajas *et al.*, 2005).

3. Componentes elementales de la maduración (CEM).

Durante la maduración ocurren interacciones complejas entre los componentes elementales, entre las que se encuentran:

- 1) Los factores extrínsecos; como la temperatura y humedad relativa de las cámaras de maduración, la calidad del aire circundante, etc.
- 2) Los factores intrínsecos o fisicoquímicos; como el pH, % de NaCl, % de acidez, potencial redox (E^0), a_w , sustancias inhibitorias como bacteriocinas o lantibióticos, etc.
- 3) Los componentes individuales del alimento; como son el % de humedad, % de proteínas, % de grasa, % y tipo de CHO'S, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos, etc.
- 4) La microbiota colonizadora; como bacterias, hongos y levaduras, principalmente.

La interacción entre los componentes es la siguiente; los factores extrínsecos e intrínsecos son los que controlan el microambiente en el alimento fermentado, por lo que el tipo y desarrollo de la microbiota inicial dependerá de ellos, a medida que transcurre la maduración, los factores extrínsecos permanecen constantes a diferencia de los cambios graduales que ocurren en los factores intrínsecos como resultado de la actividad metabólica de la microbiota iniciadora sobre los componentes individuales, que dará lugar a dos efectos (1) la dinámica de la población microbiana inicial, así como la adaptación de la microbiota secundaria, y (2) la generación de nuevos aromas, sabores y texturas en el alimento (Cogan, 2000).

En muestras analizadas en el grupo de trabajo, el auténtico Cotija da ejemplo de las interacciones antes descritas. En la Figura 5 se muestran los cambios graduales de los factores fisicoquímicos que reflejan la actividad metabólica de la microbiota sobre los componentes individuales y como estos cambios originan que la población de coliformes totales, disminuya hasta prácticamente su muerte. Es importante señalar que las muestras A1 y A2 también se analizaron sensorialmente (Utrera, 2007) y fueron objeto de estudio de este trabajo.

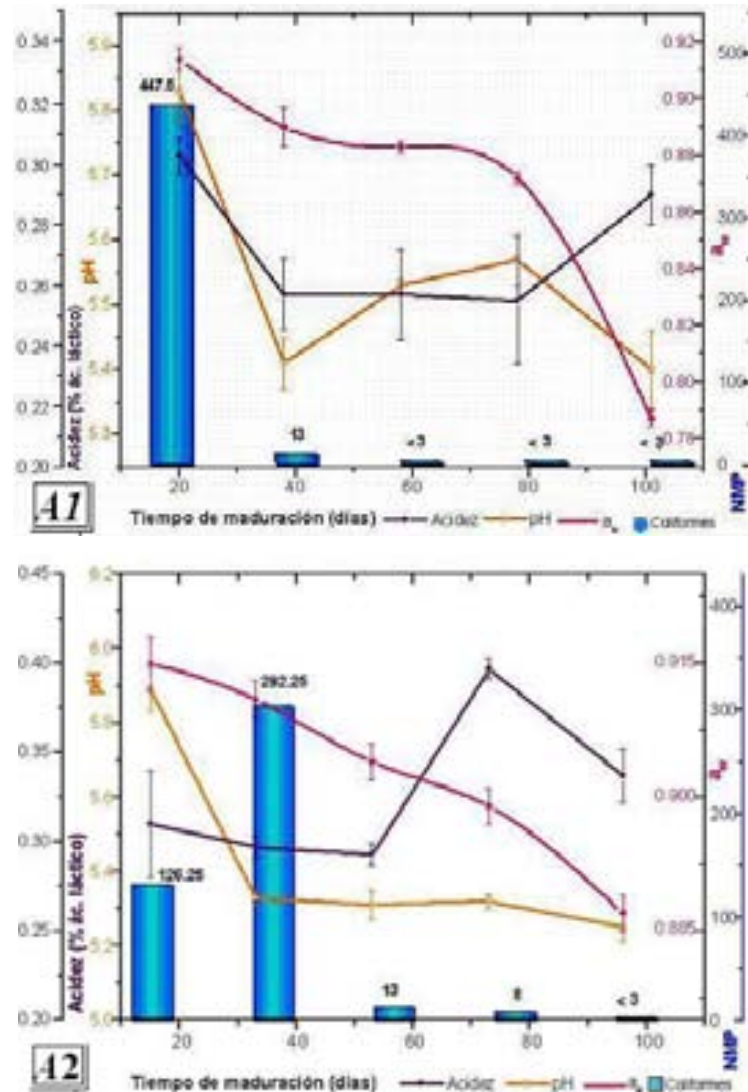


Figura 5. Interacción entre los factores fisicoquímicos y la dinámica de los coliformes en dos muestras A1 y A2 de auténtico queso Cotija (Bravo, 2008).

Es necesario resaltar que la microbiota colonizadora es el componente elemental más importante en la maduración, ya que de ésta dependen las características sensoriales del alimento (Reps, 1993).

4. Microbiota colonizadora típica en los quesos madurados de elaboración artesanal.

La microbiota presente en los quesos madurado se divide en dos grupos, la iniciadora y la secundaria.

Dentro de la microbiota iniciadora se pueden encontrar los siguientes: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, pertenecientes a la familia de las bacterias ácido lácticas (BAL's). Su principal función es acidificar el alimento para dar lugar al crecimiento de la microbiota secundaria, la cual se compone de una mezcla compleja de bacterias, hongos y levaduras (Cogan, 2000) (Tabla II), que darán lugar a las características particulares de cada variedad de queso (Beresford *et al.*, 2001).

Cuando se conoce el efecto de la microbiota en las características sensoriales del alimento, el cultivo iniciador y la microbiota secundaria se adicionan intencionalmente como cepas puras o mezclas bien definidas, asegurándose que sean los únicos microorganismos que dirijan la maduración. En la mayoría de los procesos tradicionales se desconoce el efecto de la microbiota y, aún más, la identidad de ésta.

En el Cotija no se adiciona un cultivo iniciador, sin embargo la ausencia de un tratamiento térmico en el proceso, da pauta a la participación de la microbiota propia de la leche, de la sal de mar y del ambiente propio de la ordeña, elaboración y maduración.

Hasta el momento del queso Cotija clasificado por su tiempo de maduración como añejo, se han aislado e identificado a *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus piscifermentans*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Yarrowia lipolytica* y *Candida zeylanoides*, que se clasifican típicamente como microbiota secundaria (Tabla II), además de *Bacillus pumilus* todas ellas reconocidas por su actividad lipolítica (García, 2006). Así como a *Bacillus subtilis*, *Bacillus flexus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus sciuri* y *Enterococcus faecalis* reconocidas por su actividad proteolítica (Hernández, 2007a). La identificación se hizo mediante pruebas bioquímicas y secuenciación de la región V3 del gene ADNr 16S para las bacterias o secuenciación del dominio D1-D2 del ARNr 26S para las levaduras.

El género *Bacillus* se ha identificado en ambientes de granja, forrajes, tetas, ubres y leche bronca (Saeta, 1983), mientras que el género *Staphylococcus* se ha identificado en productos fermentados de pescado, en la piel y ubres del ganado (Pantucek *et al.*, 1999). El género *Enterococcus* también se ha identificado en leche bronca, alimentos fermentados como quesos, carnes, pescado y vegetales (Vancanneyt *et al.*, 2002).

Tabla II. Microbiota secundaria típica en quesos madurados.			
Bacterias ácido lácticas no iniciadoras			
Género	Especie	Fisiología	Aislado de
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. paracasei</i>	Cocos o Bacilos Gram-positivos aerobios	Quesos
Otras bacterias			
<i>Arthrobacter</i>	-----	Coco Gram-positivo aerobio obligatorio	Tierra
<i>Brevibacterium</i>	<i>B. linens</i> , <i>B. casei</i> , <i>B. iodinum</i> , <i>B. epidermidis</i>	Coco Gram-positivo aerobio obligatorio	Queso, leche y de la piel
<i>Corynebacterium</i>	16 reconocidas <i>C. flavescens</i> y <i>C. variabilis</i>	Bacilo Gram-positivo anaerobio facultativo	Superficie del queso Dutch
<i>Microbacterium</i>	13 reconocidas <i>M. lacticum</i>	Coco Gram-positivo	Leche
<i>Pediococcus</i>	8 reconocidas	Coco Gram positivo	Quesos duros
<i>Brachybacterium</i>	<i>B. alimentarium</i> y <i>B. tyrofermentans</i>	Coco Gram-positivo Anaerobio facultativo	Queso Comté y Beaufort
<i>Rhodococcus</i>	-----	Bacilo Gram-positivo aerobio	Tierra y estiércol
<i>Micrococcus</i>	17 reconocidas	Coco Gram-positivo aerobio estricto	Superficie del queso Comté y blue
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. freudenreichii</i> , <i>P. jensenii</i> , <i>P. thoenii</i> y <i>P. acidipropionici</i>	Bacilo Gram-positivo aerobio o microaerofilico	Quesos y piel humana
<i>Staphylococcus</i>	19 reconocidas	Coco Gram-positivo anaerobio facultativo	Piel y fosas nasales de vaca

(Beresford *et al.*, 2001)

Tabla II. Microbiota secundaria típica en quesos madurados.			
LEVADURAS		HONGOS	
Especie	Aislado de	Especie	Aislado de
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Superficie de quesos Camembert y Gorgonzola.	<i>Penicillium roqueforti</i>	Roquefort, Gorgonzola
<i>Galactomyces geotrichum</i>			
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Quesos	<i>Penicillium camemberti</i>	Danish azul, Camembert
<i>Kluyveromyces lactis</i>			
<i>Yarrowia lipolytica</i>			
<i>Candida zeylanoides</i>			

(Beresford *et al.*, 2001)

5. Diferenciación sensorial del auténtico queso Cotija.

En esta sección puntualizaremos las diferencias que existen entre el Cotija auténtico y el elaborado en otras regiones en cuanto a materia prima, proceso y composición, lo que lleva a la generación de atributos sensoriales diferenciables (Tabla III y IV), como lo muestra Utrera (2007).

Tabla III. Composición química promedio del auténtico queso Cotija rendido y otro similar, base seca.		
Componente	Auténtico	No auténtico (Pijijilpan, Chiapas)
Proteína total (%)	39 – 47	50.2
Grasa butírica (%)	37 - 46	31.9
Minerales (%)	8.7 - 11.2	15.6
NaCl (%)	4.7 - 7.4	14.45
CHO'S (%)	0.12 - 0.24	0.43
a_w	máx 0.90	0.91
pH	4.8 – 5.2	3.67
Acidez (% ác. láctico)	0.20-0.32	0.42

(Hernández, 2007b).

Tabla IV. Relación de las características sensoriales y las condiciones de elaboración del queso Cotija.			
Condición	Auténtico	No auténtico	Atributo Sensorial, que se afecta según la condición:
Materia Prima			
Leche proveniente de	Cebú o criollo	Holstein	Sensación grasa
Alimentación	Libre pastoreo	Alimento para ganado	Color
Proceso			
Corte de la cuajada	En cuadritos	En cruz	Granulosidad, uniformidad y estructura del queso
Salado	% variable	% variable	Nota salada
Desuerado y Prensado	Intenso	Ligero	Dureza, cohesividad, firmeza
Oreado y Maduración	Estrictamente 100 días	Tiempo variable	Nota agria, Sabor a queso Cotija

(Utrera, 2007).

En el análisis sensorial realizado por Utrera, (2007) además de otras muestras de queso Cotija auténtico se compararon las muestras A1 y A2, con otros quesos similares entre ellos el elaborado en Pijijilpan, Chiapas (las tres muestras fueron objeto de este trabajo). Se estudiaron 24 atributos agrupados de acuerdo a la característica a evaluar:

- Apariencia: color, homogeneidad de color, brillo, granulosidad, humedad, uniformidad de la muestra y estructura interna del queso.
- Olor: nota agria e intensidad global del estímulo.
- Textura en boca: dureza, cohesividad, adhesividad, granulosidad, humedad, masticabilidad y sensación grasa.
- Textura táctil: aspereza superficial, fracturabilidad y desmoronabilidad.
- Sabor: nota salada, nota agria, astringencia, sabor a queso Cotija e intensidad del estímulo global del sabor.

Los resultados indican que es posible la diferenciación del auténtico queso Cotija mediante los atributos de apariencia, olor y textura en boca. En cuanto a los atributos de sabor, los que permiten establecer diferencias son: la nota salada y la intensidad de sabor a queso Cotija, descrita como la suma de la nota a grasa rancia y la ausencia de notas lácteas. Mientras que el atributo de textura táctil que permite la diferenciación es la marcada aspereza del auténtico queso Cotija.

Con la posibilidad de diferenciar al auténtico queso Cotija de entre otros que se comercializan en el mercado, mediante sus atributos sensoriales y retomando la importancia de la actividad metabólica de la microbiota colonizadora en la generación de éstos, surge la pregunta:

¿Es posible diferenciar al auténtico queso Cotija por su población bacteriana?

La respuesta, hasta hace algunas décadas, no era nada fácil de averiguar, ya que en los micro-ambientes complejos, como los alimentos fermentados, las técnicas microbianas convencionales como el crecimiento en medios selectivos y la caracterización morfológica y bioquímica, sólo permiten conocer una pequeña fracción de la diversidad microbiana, menos del 1% de la población total, dato obtenido al analizar muestras de suelo (Muyzer & Smalla, 1998; Torsvik *et al.*, 1998; Giller *et al.*, 1997; Pace, 1997; Borneman *et al.*, 1996), debido a que la mayoría de los microorganismos resultan difíciles de cultivar o son no cultivables, porque su crecimiento depende de las actividades de otros microorganismos o porque se desconocen las condiciones para su cultivo (Díaz & Wachter, 2003; Amann *et al.*, 1995).

6. Estudio de la diversidad microbiana mediante el análisis de secuencias conservadas ADNr 16S.

La problemática antes expuesta, llevó al desarrollo de estrategias basadas en métodos moleculares que permiten detectar e identificar de forma rápida y directa especies y hasta subespecies de microorganismos presentes en una muestra sin necesidad de cultivarlos (Beresford *et al.*, 2001).

La identificación se basa en la comparación de secuencias nucleotídicas de genes individuales de sus genomas con las bases de datos. Los genes que codifican para el RNA ribosomal son los más utilizados, ya que estas moléculas son funcionalmente constantes, se encuentran distribuidas universalmente y reflejan la relación evolutiva de los microorganismos (Case *et al.*, 2007). Además presentan regiones hipervariables o secuencias huella, flanqueadas por regiones moderadamente conservadas, las cuales permiten la identificación de especies microbianas (Van de Peer *et al.*, 1996) y el alineamiento con cebadores universales (McCabe *et al.*, 1999), respectivamente.

Las regiones hipervariables son nueve (Figura 6): 69-99, 137-242, 433-497, 576-682, 822-879, 986-1043, 1117-1173, 1243-1294 y 1435-1465, respectivamente, la numeración se basa en el sistema de nomenclatura de *E. coli* (Brosius *et al.*, 1978). De éstas, las regiones V2, V3 y V6 son las que presentan el máximo poder discriminatorio entre especies bacterianas, por contener la máxima heterogeneidad nucleotídica (Chakravorty *et al.*, 2007). La ventaja que presenta la región V3 sobre la V2, 65 nucleótidos versus 106 nucleótidos, es su menor tamaño preferido en los ensayos de PCR-tiempo real (Chakravorty *et al.*, 2006).

Se ha observado que el gene ADNr 16S está presente en múltiples copias, de 1 a 15, en un gran número de bacterias; por mencionar algunos ejemplos, el orden *Lactobacillales* contiene de 4-6 copias, los *Clostridiales* de 5-11 copias, los *Thermoanaerobacteriales* 4 copias y los *Bacillales* de 5-13 copias, en promedio 4.1 copias por genoma (Case *et al.*, 2007; Klappenbach *et al.*, 2001), estas multicopias presentan heterogeneidad intragenómica concentrada en específicas regiones llamadas “heterogeneity hot spots”, localizadas entre las asas 6, 9-11, 17, 33, 34, 39 y 41 (Figura 6), la numeración de las asas concuerda con lo descrito por Cannone y colaboradores, (2002).

Existen dos hipótesis que explican la presencia de múltiples copias del gene ADNr, la primera propone una diferenciación funcional que permite la expresión diferencial del operón (Gunderson *et al.*, 1987) o bien para provocar un crecimiento rápido de la bacteria al verse favorecida la traducción (Klappenbach *et al.*, 2000), ambas como respuestas a cambios ambientales.

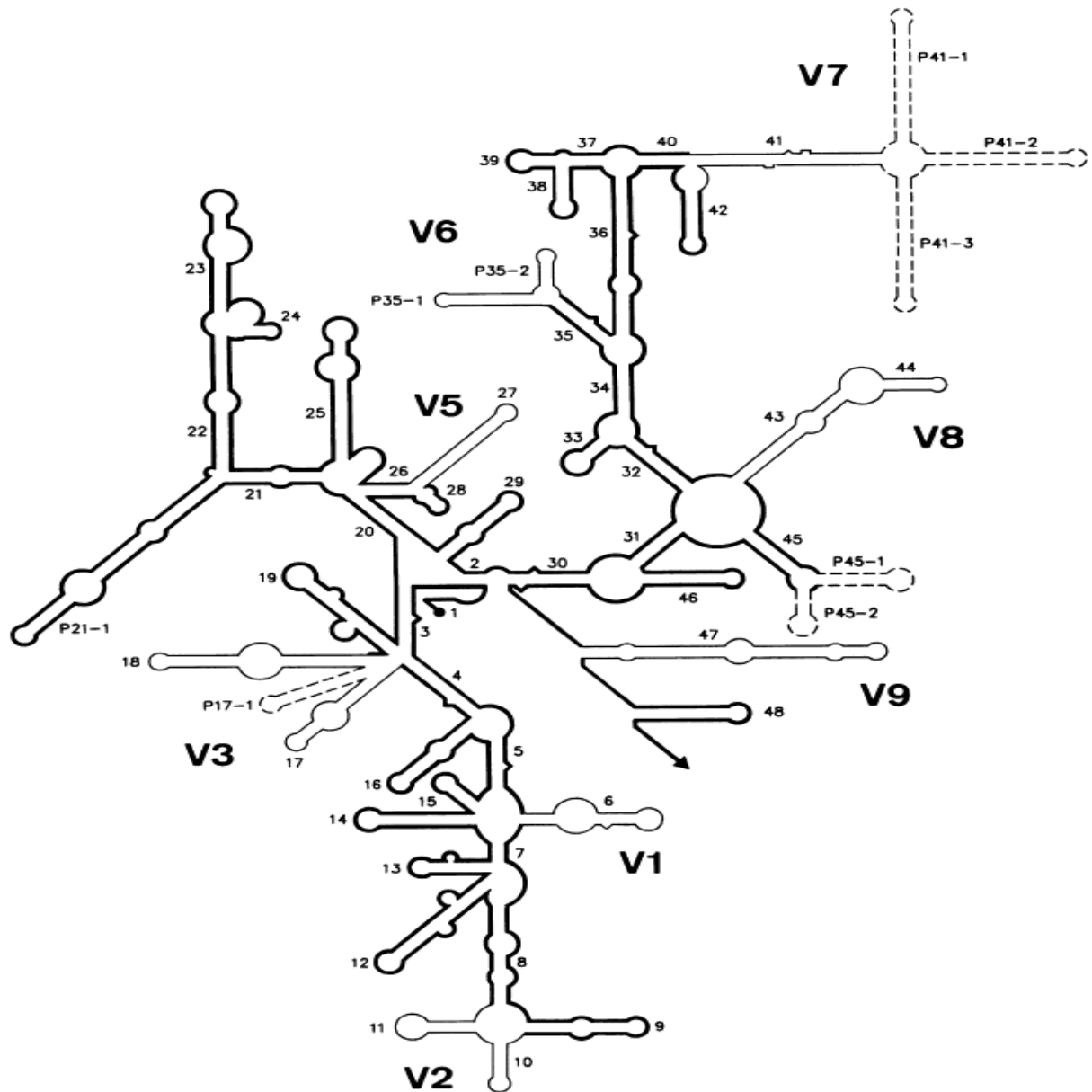


Figura 6. Estructura secundaria del gene ADNr 16S; regiones hipervariables (V1-V9) y conservadas (Neefs *et al.*, 1990).

7. Descripción de la técnica PCR-DGGE.

Cuando se pretende identificar a los miembros de una comunidad microbiana a partir de una mezcla de material genómico muy diverso, antes de llegar a las etapas de secuenciación y comparación con las bases de datos, es necesario amplificar y separar mediante una técnica analítica de alta resolución, las regiones que se emplearán como marcador de identidad.

Para la amplificación exponencial de regiones específicas del genoma, procariote o eucariote, se emplean según sea el caso cebadores universales o específicos. Cabe mencionar que durante la síntesis *in vitro* de ADN, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede dar la amplificación preferencial de los fragmentos de ADN con bajo contenido de G+C sobre los fragmentos que tienen un alto contenido de G+C, esto es debido a la facilidad o dificultad de disociación, respectivamente, que define la eficiencia de la amplificación ya que en la PCR la competencia por reactivos y la rapidez con la que se lleve a cabo la desnaturalización y alineación de los cebadores son etapas limitantes. Esta amplificación preferencial también está en función de la selección de los cebadores, del número de ciclos de replicación y de la heterogeneidad del ADN_{patrón} propia de comunidades complejas (Wintzingerode *et al.*, 1997).

El DGGE (electroforesis en gel de acrilamida con gradiente desnaturalizante) es un método independiente de cultivo, recientemente incorporado al estudio de comunidades microbianas que permite separar fragmentos de ADN, previamente amplificados por PCR, de la misma longitud, no mayor a 500pb, pero de diferente secuencia, es decir, que contienen dominios con grados de desnaturalización (T_m) característicos. La separación de la mezcla de amplicones (Figura 7) se basa en su movilidad electroforética individual en un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante lineal, de una mezcla de urea y formamida, paralelo a la dirección de la electroforesis (Ercolini, 2004). Así, conforme los fragmentos de ADN de doble cadena van migrando, éstos se van desnaturalizando parcialmente, dependiendo de su T_m , formando una molécula enramada que ocupará una posición determinada en el gel, por lo que se separan.

Para ello es necesario que el fragmento de ADN contenga en su extremo 5' una secuencia adicional de aproximadamente 40 nucleótidos de guanina + citosina, llamada grapa GC (Sheffield *et al.*, 1992 y 1989).

Como resultado de la separación de los amplicones en el gel de acrilamida, se observa un número variable de bandas a lo largo del gel, dependiendo de la diversidad de las secuencias amplificadas, este patrón de bandas generado, es considerado como una huella génica de la comunidad microbiana de la muestra.

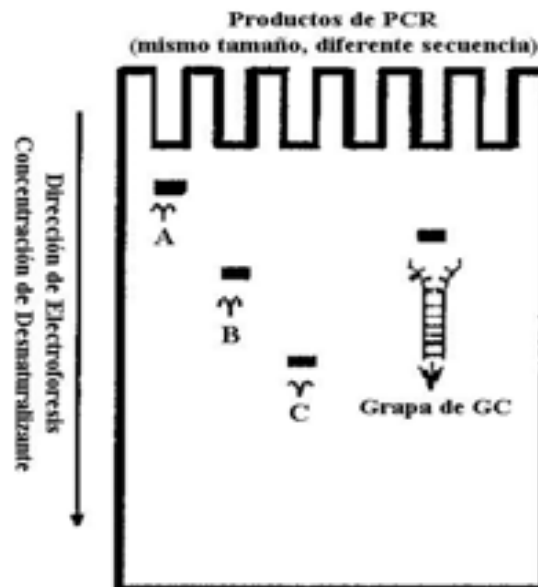


Figura 7. Migración de fragmentos de ADN en un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante paralelo (DGGE) (Bolaños, 2004).

En principio cada una de las bandas debería representar a un microorganismo diferente (Muyzer & Smalla, 1998), sin embargo se debe ser muy cuidadoso en la interpretación ya que un microorganismo puede estar representado por más de una banda lo que se conoce como microheterogeneidad (Gelsomino *et al.*, 1999; Duineveld *et al.*, 2001), en el caso de usar el gene de identidad ADNr 16S, ya que puede estar en multicopia (Nubel *et al.*, 1996). O bien que una banda represente más de un microorganismo, la co-migración (Buchholz-Cleven *et al.*, 1997; Fesefeldt & Gliesche, 1997; Kowalchuk *et al.*, 1997; Rossello-Mora *et al.*, 1999), lo que dificulta la identificación ya que impide recobrar secuencias “limpias”, esto es, que hayan sido originadas por un sólo microorganismo.

Antes de iniciar con el análisis de fragmentos de ADN por DGGE es necesario determinar el gradiente óptimo para la separación de los fragmentos amplificados de ADN, para evitar en lo posible la co-migración, para ello se elabora un gel con gradiente desnaturante perpendicular al campo electroforético (Figura 8), por lo que el gradiente se incrementara de izquierda a derecha.

En el lado izquierdo del gel, donde la concentración del desnaturante es baja, la mezcla de amplicones migra conservando su estructura de doble cadena, en el otro lado del gel, donde la concentración del desnaturante es alta, la doble cadena de los amplicones se funde totalmente, tomando una estructura enramada, tan pronto como entra en el gel, por lo que su corrimiento es nulo. En ambos casos la separación de los amplicones es imposible. En las concentraciones intermedias del desnaturante, los fragmentos amplificados tienen diferentes grados de fusión lo que corresponde a diferentes grados de movilidad, lo que lleva a la separación (Fischer & Lerman, 1983 y 1979; Myers *et al.*, 1987).

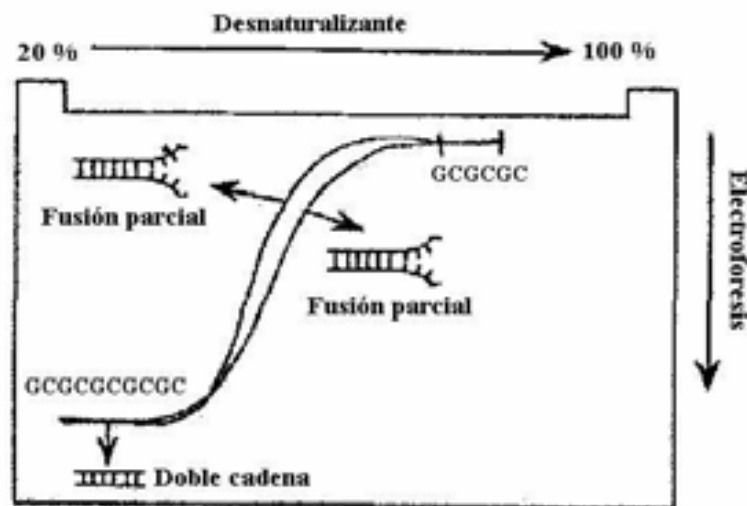


Figura 8. Gel perpendicular de DGGE (Bolaños, 2004).

La técnica de la DGGE ofrece además de separar los amplicones, la posibilidad de seguir la dinámica en las poblaciones microbianas por efecto de los cambios en su microambiente, se pueden analizar múltiples muestras simultáneamente, además de ser reproducible (Muyzer, 1999), para que las bandas puedan ser visualizadas es necesaria la presencia mínima de 10^5 a 10^7 UFC/mL (Theunissen *et al.*, 2005; Fasoli *et al.*, 2003). Este límite de detección también puede ser interpretado como el 1 al 2% de la población microbiana relativa, con respecto a la microbiota total (MacNaughton *et al.*, 1999).

8. PCR-DGGE en el estudio de comunidades bacterianas en quesos madurados.

La técnica ha sido empleada en el estudio de la diversidad bacteriana en el queso tradicional Domiati de origen egipcio, en el cual se identificaron por comparación con patrones de migración (Ogier *et al.*, 2004) y secuenciación de la región V3 del gene ADNr 16S de las bandas escindidas del gel, a bacterias lácticas dominantes como: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus garvieae*, *Aerococcus viridans*, *Lactobacillus versmoldensis*, *Pediococcus inopinatus* y a *Lactococcus lactis*, entre otras especies no lácticas poco frecuentes como *Kocuria rhizophila*, *Kocuria kristinae*, *Kocuria halotolerans*, *Arthrobacter spp.*, *Brachybacterium tyrofermentans*, *Staphylococcus spp.* y *Vibrio spp.* Todas ellas halotolerantes y relacionadas con ambientes marinos (El-Baradei *et al.*, 2007).

Otro estudio donde se aplicó el PCR-DGGE fue para conocer la diversidad y dinámica de la comunidad bacteriana dominante en la producción y maduración (90 días) del queso español Cabrales venas-azules, donde se identificó utilizando la región V3 del gene ADNr 16S a *Lactococcus lactis* subs. *lactis* como dominante en la leche y hasta el fin de la maduración, *Lactococcus raffinolactis* presente desde la leche se mantuvo hasta los 60 días de maduración, mientras que *Lactobacillus kefir* y *Lactobacillus buchneri* se presentaron hasta los 15 días de iniciada la maduración, en cuanto a la co-migración se detectaron a *Lactobacillus plantarum* y a *Lactobacillus paraplantarum* como microorganismos cuyos amplicones migraron la misma distancia (Flórez & Mayo, 2006).

En el queso Stilton la técnica permitió la identificación por secuenciación de la región V3 del gene ADNr 16S a *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Staphylococcus equorum* y *Staphylococcus sp* (Ercolini *et al.*, 2003).

Otro ejemplo del uso de esta técnica fue para monitorear los cambios de la comunidad bacteriana durante la maduración del queso Siciliano, se utilizó la región V6-V8 del gene ADNr 16S, se encontró que los cambios de la estructura microbiana durante la producción fueron dramáticos, ya que en la leche bronca las bacterias mesofílicas como *Leuconostoc*, *L. lactis* y *Macrococcus caseolyticus* fueron la microbiota predominante, mientras que durante la maduración *S. thermophilus* fue el microorganismo predominante (Randazzo *et al.*, 2002).

En el suero del queso Mozzarella se identificaron por comparación de la región V3 del gene ADNr 16S cuatro bacterias lácticas: *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus crispatus*, mediante la PCR-DGGE como técnica independiente de cultivo, y a *Lactobacillus fermentum* y *Enterococcus faecalis* usando técnicas dependientes de cultivo (Ercolini *et al.*, 2001b).

Es importante resaltar que la región V3 del gene ADNr 16S fue utilizada por la mayoría de los investigadores para la clasificación de las bacterias. La acertividad e intervalo de confianza de la clasificación mediada por la comparación de fragmentos de 100pb en promedio de dicho gene, varía enormemente dependiendo de la sección de la que se elija (Wang *et al.*, 2007). Por ejemplo, las regiones hipervariables V2 y V4 permitieron clasificar en el estudio realizado por Sandberg y colaboradores, (2001) acertivamente secuencias a nivel de género y familia, con un intervalo de confianza del 82% y 90%, respectivamente.

En el mapeo del gene ADNr 16S de 5,014 secuencias (Figura 9), realizado por Wang y colaboradores, (2007) observaron que las regiones hipervariables fueron en general, más acertadas en la clasificación que las regiones más conservadas (Figura 9A). Igualmente el intervalo de confianza promedio estimado mediante el análisis por Bootstrap fue más alto en dichas regiones (Figuras 9B).

Las regiones hipervariables se encuentran flanqueadas por regiones conservadas y/o semiconservadas. Estas últimas comúnmente incrementan la acertividad de la clasificación y amplían los picos de certidumbre de las regiones hipervariables contiguas (Figura 9). Las regiones V2 y V4, se encuentran flanqueadas por regiones semiconservadas.

Por lo anterior, situandonos en la Figura 9, la región hipervariable V3 del gene ADNr 16S, que comprende las bases 433 a la 497, de conformidad con el sistema de nomenclatura de *E. coli* (Brosius *et al.*, 1978). Permitira obtener una acertividad en la clasificación a nivel de género del 75%, con un intervalo de confianza del 80%. Cifras considerables en comparación con el 82% de acertividad observado para las regiones hipervariables V2 y V4 con intervalo de confianza del 90%, mismos que fueron los mayores porcentajes presentados de entre las 9 regiones hipervariables del gene ADNr 16S.

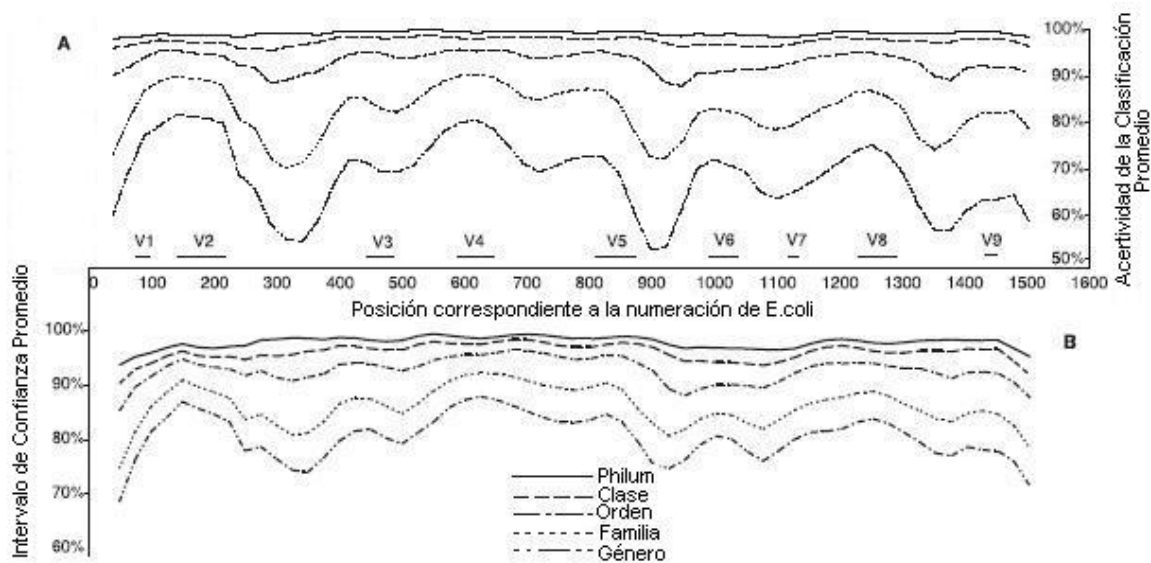


Figura 9. (A) Acertividad de la clasificación para segmentos de 100 bases de la secuencia completa del gene ADNr 16S, moviendo 25 bases a la vez. Las barras paralelas al eje de las abscisas definen las regiones hipervariables. El promedio de la acertividad de la clasificación a nivel de género fue mayor al 70% para todas las regiones de 100 bases. (B) Intervalo de confianza promedio estimado por Bootstrap (Wang *et al.*, 2007).

Como se ha hecho ver el PCR-DGGE es una técnica que ha permitido a otros investigadores seguir la dinámica de la población bacteriana y su identificación en distintas etapas del proceso, por lo que se piensa que la aplicación de dicha técnica en el estudio de la comunidad bacteriana del queso Cotija conducirá en un futuro a lograr grandes avances en el entendimiento de ecosistemas complejos y su impacto en la maduración del queso, conservación y calidad.

9. El papel de los *Enterococcus* en alimentos fermentados.

El género *Enterococcus*, perteneciente al grupo de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL's), son células Gram (+) catalasa (-) generalmente ovoides, no esporuladas, se pueden observar solitarias, en pares o en cadenas cortas, algunas especies son móviles, anaerobias facultativas, quimiorganótrofas, con requerimientos nutricionales complejos, productoras de ácido láctico como principal metabolito de la fermentación (Devriese & Pot, 1995). Se han propuesto más de 20 especies que conforman el género (Figura 10), tales como *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. porcinus*, *E. raffinosus*, *E. sulfureus*, *E. villorum*, por mencionar algunos (Hardie & Whiley, 1997). Se encuentran típicamente en el tracto intestinal, y heces de humanos y de una amplia variedad de animales, también han sido aisladas del suelo, agua, plantas, materia prima cruda como leche y carne, así como en alimentos procesados e inclusive pasteurizados (Devriese & Pot 1995; Franz *et al.*, 2003; Mathur & Singh, 2005). Se les reconoce por su capacidad de crecer y sobrevivir en un amplio rango de condiciones ambientales que son inusuales para un gran número de eubacterias, como son temperaturas entre los 10 y 45 °C, e inclusive sobrevivir a 60°C hasta por 30 min, pH extremo de 9 a 6 y salinidad igual o superior a los 6.5%, lo que les permite tener una distribución casi ubicua (Hardie & Whiley, 1997; Pérez-Pulido *et al.*, 2006).

Este género ha sido reconocido por su papel benéfico en las fermentaciones de alimentos de origen cárnico, lácteo y vegetal (Giraff, 2002; Hugas *et al.*, 2003). En los quesos madurados los niveles de *Enterococcus* reportados superan los 10^5 - 10^7 UFC/g por lo que su presencia se ve favorecida en comparación con los quesos crudos, donde se han encontrado en una concentración de 10^4 - 10^6 UFC/g (Del Pozo *et al.*, 1988; Franz *et al.*, 2003; Manolopoulou *et al.*, 2003). La variación de dichos niveles depende principalmente del tipo de queso, de la estación del año en que se haya producido y de la carga microbiana presente en la leche (Sarantinopoulos *et al.*, 2001a). Las especies predominantes en los quesos madurados como el Manchego (Ordoñez *et al.*, 1978), Mozzarella (Coppola *et al.*, 1988) y Emmental (Teuber *et al.*, 1996), son *E. faecium* y *E. faecalis*.

Su presencia y papel que desempeñan durante la maduración ha sido ampliamente estudiada en quesos europeos (Tabla V) (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006) elaborados tradicionalmente.

La presencia de los *Enterococcus* en la leche, y por ende en el queso, por muchos años se atribuyó a las malas prácticas de higiene en el proceso, así como la contaminación directa con heces fecales de humanos y animales. Sin embargo recientemente se ha propuesto que su presencia es debida al uso de agua contaminada, a la inadecuada limpieza de las superficies externas de los animales, al equipo de ordeña y a los contenedores de la leche (Gelsomino *et al.*, 2002; Giraffa, 2002).

Tabla V. Quesos Europeos donde se ha estudiado la presencia del género *Enterococcus*.

ORIGEN	QUESO	Tipo de leche	ORIGEN	QUESO	Tipo de leche
Francés	Comté	Vaca	Italiano	Monte Veronese	Vaca
	Roquefort	Vaca	Italiano	Mozzarella	Vaca
	Venaco	Oveja/cabra	Italiano	Pecorino Sardo	Oveja
Griego	Farmhouse cheese	Oveja	Italiano	Semicotto Caprino	Cabra
	Feta	Oveja	Italiano	Montasio	Vaca
	Feta and Teleme	Oveja	Español	Armada	Cabra
	Kefalotyri	Oveja	Español	Arzúar	Vaca
	Orinotyri	Oveja	Español	Cebreiro	Vaca
Pichtogalo Chanion	Oveja/Cabra	Español	Cebreiro	Vaca	
Iraní	Cheddar	Vaca	Español	Majorero	Cabra
Portugués	Serra da Estrela	Oveja	Español	La Serena	Ovejas
	Serra da Estrela	Oveja	Español	Manchego	Ovejas
Italiano	Bufalo Mozzarella	Buffalo	Español	Roncal-Idiazabal	Ovejas
	Fiore Sardo	Oveja	Español	San Simón	Vaca
	Fontina	Vaca	Español	Tenerife	Cabra
	Montasio	Vaca	Español	Tetilla	Vaca

El rol que desempeñan algunas especies de *Enterococcus* presentes en los quesos fermentados son de suma importancia ya que contribuyen en las propiedades organolépticas y contrario a lo que se pensaría, en la calidad sanitaria por su capacidad de producir enterocinas (Vancanneyt *et al.*, 2002; De Vuyst *et al.*, 2003).

Su contribución en las propiedades organolépticas, como desarrollo de aroma se debe principalmente a su actividad proteolítica y esterolítica al producir importantes compuestos volátiles como el etanol, acetato, acetona, acetaldehído, acetoína y diacetilo (Centeno *et al.*, 1996; Casalta & Zennaro 1997; Sarantinopoulos *et al.*, 2001a y 2001b; Franz *et al.*, 2003 y 1999).

Siguiendo con la contribución de los *Enterococcus* en las características sensoriales Sarantinopoulos y colaboradores, (2002) demostraron que el uso de *E. faecium* FAIR-E 198 y FAIR-E 243 agregadas como adjunto de un cultivo iniciador favorece positivamente el sabor, aroma, color y estructura del queso Feta, además de propiciar el desarrollo de cocos mesófilos y bacilos termófilos. Sobre esta línea existen otros trabajos donde se evalúa el efecto de las especies *E. faecium*, *E. durans* y *E. faecalis*, principalmente, usadas como cultivos iniciadores o adjuntos en quesos madurados como el Cheedar (Jensen *et al.*, 1975a y b) y buffalo Mozzarella (Villani & Coppola 1994), entre otros.

Actualmente, la British Advisory Comité on Novel Foods and Processes (ACNFP) acepta el uso de la cepa *E. faecium* K77D como cultivo iniciador en la fermentación de productos lácteos (ACNFP, 1996).

Por otro lado, la capacidad de los *Enterococcus* de producir enterocinas ha llevado a la búsqueda de cepas productoras en diversos ambientes tales como carne, pescado, vegetales y quesos fermentados, así como al estudio de su efecto al ser adicionadas como cultivo iniciador o bien la enterocina purificada.

Nuñez y colaboradores, (1997) concluyen en su trabajo que *E. faecalis* INIA 4, adicionada como adjunto es capaz de producir la enterocina aún en competencia con la microbiota nativa de la leche durante la fabricación del queso Manchego. Por su parte Giraffa y colaboradores, (1994) mostraron que las enterocinas también se producen en presencia de la renina durante las primeras 55 h de producción del queso Taleggio. Con respecto a la adición de enterocinas purificadas Foulquié-Moreno y colaboradores, (2003) mostraron que la enterocina 1146 producida por *E. faecium* DPC 1146 al adiclarla en leche tenía actividad bactericida contra *L. monocytogenes*. En general se ha visto que las enterocinas tienen actividad sobre *Listeria* y *Clostridium*, principalmente, (Mendoza *et al.*, 1999; Benik *et al.*, 1999) así como también contra bacterias Gram (-) como *E. coli* (Gálvez *et al.*, 1989) y *Vibrio cholerae* (Simonetta *et al.*, 1997).

La selección de los *Enterococcus* que participen en los alimentos fermentados debe ser muy cuidadosa ya que a este género se le ha involucrado en infecciones oportunistas e intoxicaciones (Franz *et al.*, 1999; Hardie & Whiley, 1997; Kayser, 2003; Lopes *et al.*, 2005).

Entre los criterios de selección destaca la ausencia de factores de virulencia tales como las proteínas de superficie extracelular y sustancias de agregación que promueven la adherencia a las células del hospedero (Pérez-Pulido *et al.* 2006), con lo cual se imposibilitaría la colonización y por ende dejarían de representar un riesgo para la salud (Vancanneyt *et al.*, 2002; De Vuyst *et al.*, 2003), entre otros criterios importantes son la resistencia a antibióticos (Mathur & Singh, 2005) y la secreción de citolisina (Franz *et al.*, 2003).

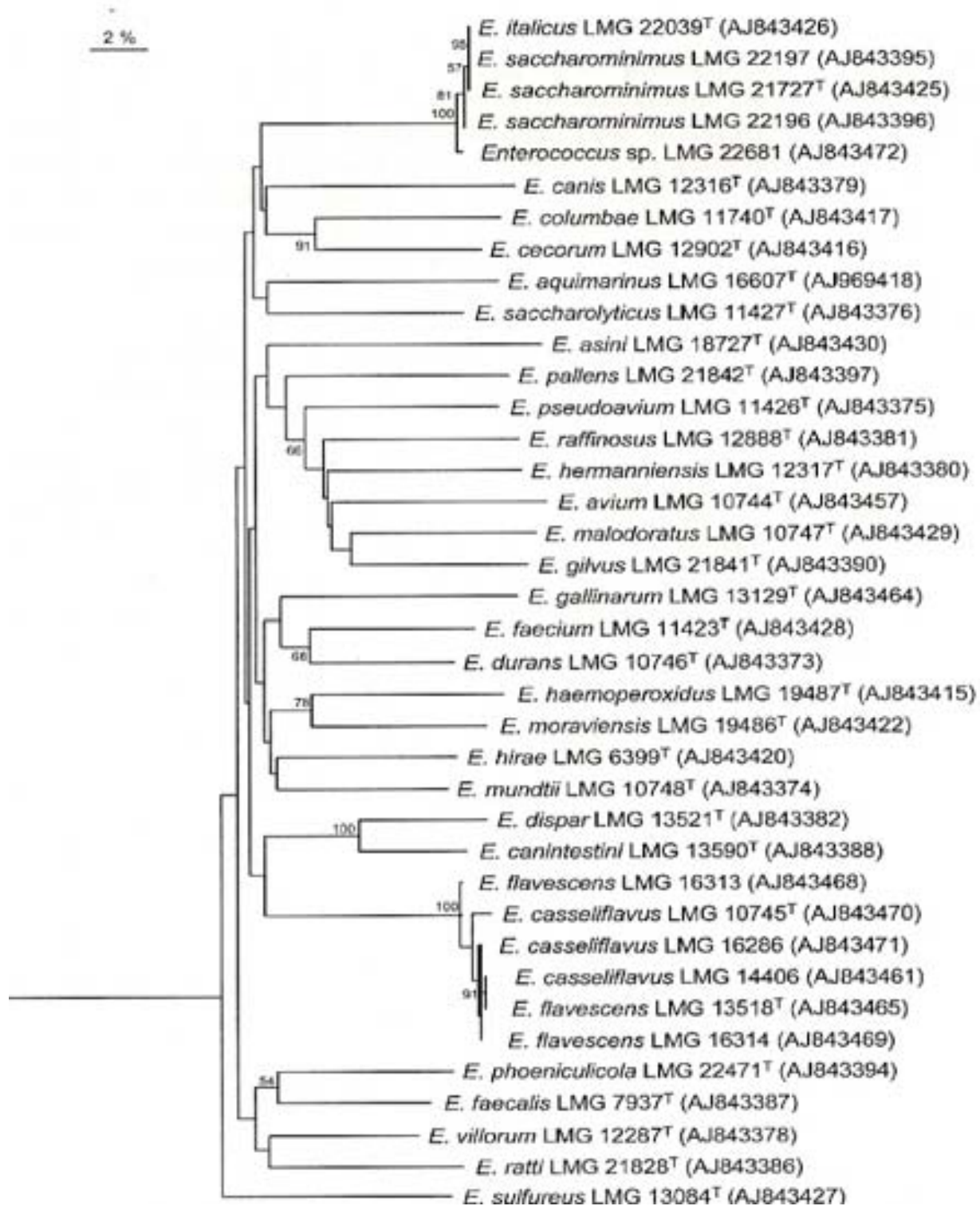


Figura 10. Árbol filogenético de las especies de *Enterococcus* derivado de la secuencia del gene ADNr 16S (Naser *et al.*, 2006).

III. JUSTIFICACIÓN.

El obtener la denominación de origen del auténtico queso Cotija que permita su reconocimiento y comercialización nacional e internacional, ha dado origen a programas estatales e investigaciones enfocadas en conocer la composición proximal, el microambiente, la microbiota colonizadora total, los microorganismos clave en el desarrollo de los atributos sensoriales y la calidad sanitaria del producto.

Las características de calidad que distinguen al auténtico queso Cotija dependen de la microbiota colonizadora, por lo que resulta necesario conocer su identidad y comportamiento ante los cambios graduales de su microambiente, los que se van presentando durante la maduración.

En el presente trabajo se determinará cuál es la comunidad bacteriana total, para que en estudios posteriores, se defina qué bacterias participan en la generación de las características distintivas del producto, tanto sensoriales como sanitarias.

En cuanto al comportamiento de la comunidad bacteriana del queso Cotija, éste es el primer reporte que intenta describir su diversidad, dinámica y dominio relativo durante 7 meses de su maduración, utilizando métodos moleculares como lo es el DGGE aunado a la identificación por secuenciación de regiones utilizadas como marcadores filogenéticos, además de técnicas de microbiología tradicional que los complementan.

Por último, este trabajo pretende fomentar entre los investigadores el interés por el estudio de las fermentaciones tradicionales espontáneas contribuyendo así en el rescate de la riqueza endémica de la cultura mexicana.

IV. HIPÓTESIS.

El queso Cotija es un alimento de manufactura tradicional, donde no existe algún procesamiento térmico, cuya maduración es una fermentación espontánea, por lo que los microorganismos que estarían presentes durante esta etapa provendrían del ambiente y materias primas con que se elabora y su prevalencia estaría determinada por el microambiente del producto, que se caracteriza por un valor bajo de a_w .

V. OBJETIVOS.

1) Establecer el método de extracción y purificación del ADN directamente del alimento y el gradiente desnaturalizante óptimo en el DGGE.

2) Realizar el análisis global de la comunidad bacteriana y de los microorganismos huella presentes el auténtico queso Cotija, a través del análisis de bandas obtenidas por DGGE. Lo que incluye:

- Diversidad
- Dinámica del desarrollo
- Dominancia relativa

3) Conocer la identidad de algunos de los microorganismos presentes durante 7 meses de maduración del queso Cotija auténtico, utilizando métodos dependientes e independientes de cultivo.

**VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.
EMPLEADA EN EL ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DEL
QUESO "COTIJA"**



VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Descripción de las muestras.

En el estudio se analizaron tres muestras de queso Cotija: dos auténticas (A1 y A2) y una No auténtica (NoA), clasificadas de acuerdo a la descripción que señala el manual “Reglas de uso de la Marca Colectiva Región de Origen” (Barajas *et al.*, 2005):

1) La muestra No Auténtica (NoA) fue elaborada en el Mpo. Cotija, Michoacán, al momento de su compra el queso tenía 20 días de haber sido elaborado.

2) La muestra Auténtica 1 (A1) se elaboró en la ranchería “La Tinaja”, Michoacán, al momento de su compra el queso tenía 16 días de haber sido elaborado.

3) La muestra Auténtica 2 (A2) se elaboró en el Mpio. Sta. Ma. del Oro, Jalisco, al momento de su compra el queso tenía 13 días de haber sido elaborado.

4) La muestra cuajada procede de la ranchería “La Tinaja”, Michoacán.

5) La muestra chiapas se compró como producto terminado en el mercado de Pijijilpan, Chiapas.

Las muestras fueron transportadas a la Cd. de México en el interior de una hielera, A1, A2 y NoA permanecieron durante los 7 meses que duro el estudio en un cuarto de maduración a una temperatura entre los 17 - 19°C. El muestreo de A1, A2 y NoA se hizo aproximadamente cada 15 días (Tabla VI) durante 7 meses con el fin de monitorear la dinámica de la población bacteriana. Las muestras, al igual que la Cuajada y Chiapas se mantuvieron a -20°C hasta el momento de la extracción del ADN. Se considera como t0 a la muestra tomada el día de su arribo al laboratorio.

Tabla VI. Registro de la edad de maduración de las muestras analizadas.									
Muestras	Días de haber sido elaborado.								
	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8
NoA	22	40	60	80	103	141	173	214	242
A1	18	36	56	76	99	137	169	210	238
A2	15	33	53	73	96	134	166	207	235

2. Método de extracción del ADN.

Debido a que la microbiota que coloniza un alimento se encuentra protegida por los componentes del mismo (proteínas y polisacáridos principalmente), la extracción del material genético debe contemplar etapas adicionales a la metodología general, la que involucra una lisis celular, remoción de contaminantes (membranas, pared celular, proteínas, ARN) y la recuperación del ADN.

Entre las etapas adicionales se recomienda **la concentración** de los microorganismos lo que involucra la remoción del alimento ya sea por tratamientos mecánicos como el uso de morteros, perlas de vidrio, del stomacher, etc, por métodos físicos como la centrifugación o métodos enzimáticos que involucra la actividad de proteasas, celulasas, pectinasas, entre otras.

Etapa I. Concentración de biomasa.

En una bolsa para stomacher se pesaron 15 g de cada una de las muestras, sobre las cuales se adicionaron 40 mL de una solución de citrato de sodio al 2% (pH 8) y 0.5 mL de una solución de proteasas (neutrasa, Novo Nordisk), la mezcla se incubó a 45°C durante 1hr, transcurrido el tiempo, la mezcla fue homogeneizada en un Stomacher 400 (SEWARD) durante 5 min. a máx. velocidad. La suspensión resultante se vertió a un vaso de precipitados de 100 mL estéril y se dividió el volumen en tubos de centrifuga para el rotor JA-20, 20.000 RPM BECKMAN estériles (aproximadamente 20 mL) y se procedió a centrifugar a 3500 rpm durante 10 min. Con el fin de eliminar las partículas de mayor tamaño, se retiró cuidadosamente la capa superior de grasa con un hisopo y el sobrenadante se colocó en otros tubos de centrifuga asegurándose de no tocar el sedimento en el fondo del tubo. La segunda centrifugación se llevó a cabo a una velocidad de 12000 rpm durante 10 min. se retiró el sobrenadante cuidando la integridad del pellet celular.

Etapa II. Extracción del material genético total.

El procedimiento que a continuación se describe resultó ser el mejor de tres protocolos que se probaron, cuya diferencia radica principalmente en la forma de lisar la célula y la remoción de los contaminantes (Ver ANEXO I).

Protocolo Quiagen-modificado.

LISIS CELULAR.

1) Resuspender cada uno de los pellets celulares en 150 μ L de buffer TE y transvasarlos a un microtubo de 1.5 mL.

2) Adicionar 20 μ L de lisozima (20 μ g/mL) y 10 μ L de mutanolisina (2.5 U/ μ L), agitar en vortex a velocidad máxima.

3) Incubar a 37°C por 1 hr o hasta visualizar viscosidad.

4) Adicionar 10 μ L de proteinasa K (20 μ g/mL) y 20 μ L de RNAsa (10 μ g/mL), agitar en vortex a velocidad máxima.

5) Incubar a una temperatura de 65°C por 1hr. a 900 rpm en termomixer.

REMOCION DE CONTAMINANTES.

6) Adicionar 50 μ L de SDS al 10% e incubar a 65 °C por 10 min, sin agitación.

7) Terminado el tiempo de incubación, se adicionan 200 μ L de etanol al 96% (v/v) a temperatura ambiente, la mezcla se agita y se vierte todo el volumen a la columna -membrana del kit Stool QIAGEN (No. Cat. 51504).

8) Centrifugar 1 min a 14,000 rpm.

9) Adicionar 500 μ L de buffer AW1, seguido de la centrifugación por 1 min. a 14,000 rpm. cambiar tubo colector.

10) Adicionar 500 μ L de buffer AW2, seguido de la centrifugación por 3 min. a 14,000 rpm. cambiar tubo colector.

RECUPERACIÓN DEL ADN.

11) Transferir la columna a un microtubo de 1.5 mL, adicionar 200 μ L de buffer AE e incubar a 65 °C por 10 min.

12) Centrifugar por 1 min. a 14,000 rpm.

13) Almacenar el ADN eluido a 4°C.

El ADN total obtenido se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) que contenía 1 µg/mL de bromuro de etidio (BrEt). Las condiciones de electroforesis fueron 85 V por 30 min. Se procedió a determinar la pureza y cantidad del ADN total por el método espectrofotométrico 260/280 nm, así como el espectro de absorción de la muestra en un barrido de 300 – 200 nm.

Para determinar la cantidad de ADN se utilizó la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g ADN/mL} = (\text{DO}_{260\text{nm}}) (\text{Factor de conversión}) (\text{dilución})$$

Factor de conversión:

- 1 unidad $A_{260\text{nm}}$ de ADN de doble cadena = 50 µg/mL

3. Amplificación de la región V3 del ADNr 16S.

La identificación de las bacterias que integran la microbiota colonizadora en las muestras A1, A2, NoA, Cuajada y Chiapas se hizo mediante la comparación de la secuencia de la región V3 del gene ADNr 16S, por lo que fue necesario amplificar dicha región, utilizando los cebadores universales para bacterias Agc338F y B518R, Tabla VII (Ampe *et al.*, 1999). La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador Perkin Elmer 2400, las condiciones (Muyzer, 1999) y mezcla de reacción se muestran en las Tablas VIII y IX, respectivamente.

Tabla VII. Cebadores universales para PCR utilizados en este estudio.

ASAP ID	ABE-0000677	Version	m56
Nombre	rrsH	Tipo	rRNA
Genoma	Escherichia coli K-12 Strain MG1655	Tamaño	1542 pb
aaattgaagagttgatcatggctcagattgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgaacggtaacaggaagaagcttgcttcttg ctgacgagtgccggacgggtgagtaatgtctgggaaactgcctgatggaggggataactactggaaacggtagctaataccgcataacgc gcaagaccaaagagggggaccttcggcctcttgccatcggatgtgccagatgggattagctagtaggtggggtaacggctcacctaggc gacgatccctagctggtctgagaggatgaccagccacactggaactgagacacgggtccag ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT ggggaatattgcacaatggcgcaagcctgatgcagccatgccgctgtatgaagaaggccttcgggttgtaaagactttcagcggggagg aagggtgtaaagtaataaccttctgctcattgacgttaccgcagaagaagcaccggctaactccgtg CCAGCAGCCGCGGTAAT a cggaggggtcaagcgtaaatcggaattactgggcgtaaagcgcacgcaggcgggttgtaagtcagatgtgaaatccccgggctcaacctgg gaactgcatctgatactggcaagcttgagctcgtagagggggtagaattccaggtgtagcgggtgaaatgcgtagagatctggaggaatacc ggtggcgaaggcggccccctggacgaagactgacgctcaggtgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtcacg ccgtaaacgatgtcgacttgagggttgccctgagggcgtggctccggagctaacgcgtaagtcgaccgctggggagtagcggccgcaag gttaaactcaaatgaattgacggggggccgcacaagcgggtggagcatgtgggttaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctggtctgac atccacagaactttccagagatggattggtgccctcgggaactgtgagacaggtgctgcatggctgctgcagctcgtgttgtaaattggtgggta agtcccgcacagcgaacccttattctttgttgccagcgggtccggccgggaactcaaaggagactgccagtgataaactggaggaaggtg gggatgacgtcaagtcacatggcccttacgaccagggtcacacagctgctacaatggcgatacaagagaagcgacctcgcgagagca agcggacctcataaagtgcgtcgtagtcgggattggagtctgcaactcagctccatgaagtcggaatcgtagtaacgtggatcagaatgcc acggtgaatacgttcccggcctgtacacaccgcccgtcacaccatgggagtggttgcaaaagaagtaggtagctaaccttcgggaggg cgcttaccactttgtgattcatgactgggggtgaagtcgtaacaagtaaccgtaggggaacctgcgggttgatcacctccta			
Cebadores	Secuencia 5'-3'	Posición en gene	Orientación
338F	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	357-338	Hacia adelante
* Agc338F	C GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGG GGG ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	357-338	Hacia adelante
B518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG	534-518	Reversa
* La grapa GC fue fusionada al extremo 5' del cebador.			

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	Etapas
1	94	5	Desnaturalización inicial
20	94	1	Desnaturalización
	65	1	Alineación
	72	3	Extensión
10	94	1	Desnaturalización
	55	1	Alineación
	72	3	Extensión
1	72	10	Extensión final

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Amortiguador PCR	10X	1X	10
MgCl ₂	50mM	2.5 mM	5
dNTPs	2.5mM	0.2 mM	8
Cebador Agc338F	10 µM	0.4 mM	4
Cebador 518R	10 µM	0.4 mM	4
Templado	X ng/reacción	200 ng/reacción	X µL
Taq polimerasa	5 UI/reacción	2 UI /reacción	0.8
Agua destilada	-----	-----	cbp 100 µL

Los amplicones se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (p/v) que contenía 1 µg/mL de BrEt como revelador, la electroforesis se llevó a cabo a 100 V por 30 min. Se utilizó como marcador el O' Range Ruler 50pb DNA Ladder, Fermentas. La visualización se hizo en el transiluminador UV (ColePalmer). Se determinó la cantidad de la mezcla de amplicones conforme a la fórmula descrita en el apartado 2 de esta sección.

4. DGGE – perpendicular.

El gel con gradiente desnaturalizante perpendicular al campo eléctrico se realizó con el fin de establecer el intervalo desnaturalizante óptimo (representado por una “S”) para separar la mezcla de los amplicones que corresponden a la población bacteriana de las muestras A1, A2 y NoA.

Siguiendo el procedimiento descrito primeramente por Muyzer y colaboradores, (1993), se depositaron a lo largo del único pozo de un gel de poliacrilamida al 8% (p/v) con un intervalo desnaturalizante de 20% - 70% (p/v), 3 µg de la mezcla de los amplicones, de cada una de las 29 muestras. El gradiente desnaturalizante empleado se obtuvo mediante una mezcla de urea 7M y formamida al 40% (v/v). La electroforesis se realizó en el equipo DCode™ Universal Mutation de BIORAD, a 120 V durante 2 hrs. a 60 °C, en buffer TAE 1X. Posteriormente el gel se reveló con una solución de BrEt 50 µg/µL durante 15-20 min, transcurrido el tiempo se destiñó en amortiguador TAE 1X durante 10 min., se observó a través del equipo Fluor-S y se obtuvo la imagen usando el software Quantity One versión 4 para Windows, ambos (BIORAD). El equipo y preparación de las soluciones empleadas se describe en el ANEXO II.

5. DGGE-paralelo.

Siguiendo el procedimiento descrito primeramente por Muyzer y colaboradores, (1993), se cargó 3 µg del amplicón de cada una de las 29 muestras individualmente en los pozos del gel de poliacrilamida al 8% con el gradiente desnaturalizante óptimo calculado mediante el DGGE-perpendicular. La electroforesis se realizó en el equipo DCode™ Universal Mutation de BIORAD, a 85 V durante 17 hrs. a 60 °C, en buffer TAE 1X. Posteriormente los geles fueron teñidos con el kit Plus One DNA silver staining, Pharmacia Biotech, digitalizados con el software QUANTITY ONE y analizados con el software Diversity Data Base, ambos marca BIORAD. Después de la digitalización se procedió a cortar las bandas del gel y almacenarlas como se describe a continuación. El equipo y preparación de las soluciones empleadas se describe en el ANEXO II.

6. Tratamiento de las bandas escindidas del gel para secuenciación.

Para recuperar el amplicón contenido en cada banda del gel, se siguió el procedimiento experimental sugerido por Gafan & Spratt, (2005) y Ausubel y colaboradores, (2005), que consiste en cortar individualmente con un bisturí estéril las bandas de interés, posteriormente cada una de las bandas se coloca en un microtubo de 2 mL limpio y se agregan 50 μ L de agua desionizada filtrada estéril, pH 8, se incubaba a 37°C por 1 hora y se almacena a 4°C por 24 hrs, mínimo. Posteriormente el amplicón recuperado se concentra hasta obtener una concentración aproximada de 10 ng/ μ L y se **reamplifica** utilizando los cebadores 338F (sin grapa) y B518R siguiendo las condiciones y mezcla de reacción, descritas en las Tablas VIII y IX. Como último paso los amplicones reamplificados fueron purificados utilizando el kit PCR CLEAN-UP, QIAGEN siguiendo las instrucciones del proveedor y concentrados de manera que al cargar 2 μ L en un gel de agarosa puedan ser visualizados como bandas intensas. La **secuenciación** se realizó en el equipo de electroforesis capilar, ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer de Applied Biosystems, en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, empleando el cebador B518R.

Las secuencias resultantes se compararon con las reportadas en la base de datos Nacional Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nih.gov/>), utilizando los servicios del MegaBLAST para buscar los “parientes más cercanos”, y de esta manera clasificarlas dentro de un género.

En el caso de obtener secuencias indeterminadas debido a la presencia de dos o más amplicones en una banda definida en el gel. Se procedió a emplear estrategias que permitieran la identificación de la banda en cuestión, ya sea por secuenciación de uno de los amplicones separados por clonación o por comparación con patrones de migración.

7. Clonación, como método alternativo de separación.

En las bandas donde se tenía evidencia de secuenciación indeterminada por contener más de un amplicon de ARNr 16S proveniente de un sólo microorganismo. Se procedió a separar dichos fragmentos por clonación.

Se empleó el kit TOPO TA Cloning for Sequencing, INVITROGEN, el cual se apoya en la actividad transferasa terminal de la Taq polimerasa que adiciona un residuo de deoxiadenosina (A) en el extremo 3' terminal, con lo que genera un extremo cohesivo sin la necesidad de conocer la secuencia del inserto a clonar. El vector linearizado que proporciona el kit lleva en los extremos 3' terminal un residuo de deoxitimidina (T), lo que hace posible la hibridación entre el inserto y el vector (Figura 11). La ligación es realizada por la Topoisomerasa I de Vaccinia virus.

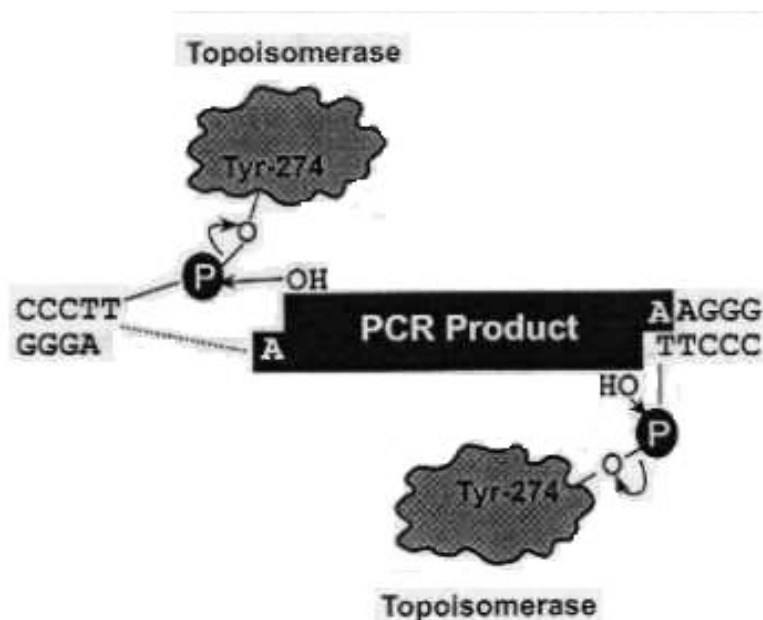


Figura 11. Esquema que ejemplifica la ligación entre el inserto y el vector (Manual de uso).

El kit contiene: 6 mL de medio S.O.C., 50 μ L de solución salina, 1 mL de agua grado biología molecular, 20 μ L (329 pmoles) del cebador T3, 11 viales con 10E9 ufc/mL de células de *E. coli* TOP10 químicamente competentes, 15 μ L del vector pCR4-TOPO (10 ng/ μ L del plásmido). Material adicional: placas y caldo LB con 50 μ g/mL de kanamicina.

El vector (Figura 12) contiene dos genes de selección, que permiten identificar las clonas que aceptaron el plásmido al expresar el rasgo de resistencia a kanamicina o ampicilina, por lo que son capaces de crecer en medios que contienen el o los antibióticos. Un gene reportero, constituido por el gene letal *ccdB* fusionado al C-terminal del fragmento *LacZ α* , que permite identificar las clonas que aceptaron el plásmido con el inserto de interés, esto es, durante la ligación el inserto interrumpe la expresión del *LacZ α -ccdB*, lo que permite que crezcan únicamente las recombinantes positivas.

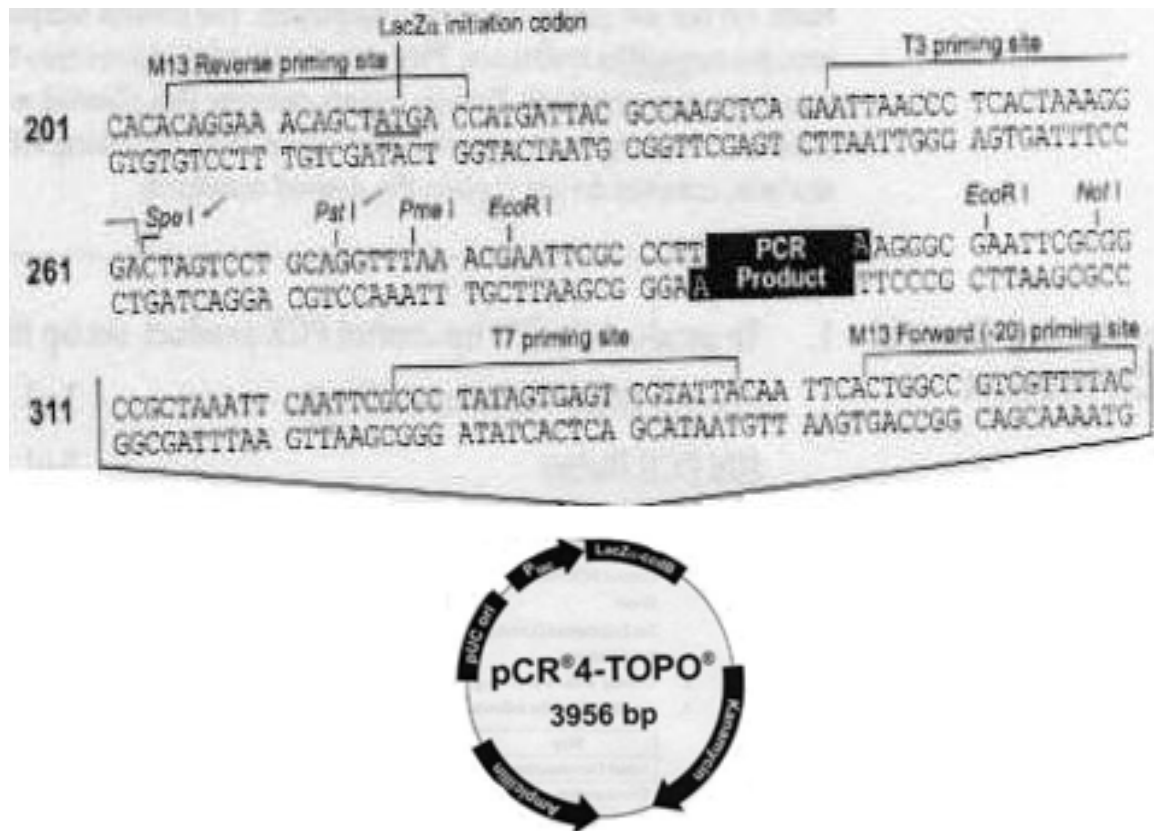


Figura 12. Secuencia y componentes del vector pCR4-TOPO (Manual de uso).

Después de conocer el fundamento, criterio de selección y contenido del kit empleado. A continuación se describe el protocolo de clonación (Figura 13):

AMPLIFICACIÓN DEL INSERTO A CLONAR.

Se reamplifico el contenido escindido de las bandas del gel con el fin de generar los extremos cohesivos 3' terminal, por lo que se adicióno a la mezcla de reacción un exceso de dNTPs 0.5 mM y se incremento el tiempo de extensión final a 20 min. Con lo que respecta a las condiciones y mezcla de reacción a excepción de los cambios mencionados se mantuvieron tal y como se describe en el apartado 3 de esta sección. Se emplearon los cebadores 338F (sin grapa) y B518R.



Figura 13. Descripción del protocolo de clonación.

OBTENCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN amplicón-vector.

1) Adicionar los reactivos en un **microtubo** de 1.5 mL, en el orden en el que se muestra en la Tabla X:

Tabla X. Mezcla de reacción construcción del plasmado.		
Reactivos	Control negativo	Muestras
Amplicon recién sintetizado	-----	1 μ L
Agua	4 μ L	3 μ L
Solución salina	1 μ L	1 μ L
pCR4-TOPO	1 μ L	1 μ L
Vol. Final	6 μ L	6 μ L

2) Mezclar la reacción e incubar por 30 min a temperatura ambiente.

3) Colocar el microtubo que contiene la reacción en hielo.

TRANSFORMACIÓN.

4) Adicionar 3 μ L de la construcción en un vial de células competentes.

5) Mezclar cuidadosamente.

6) Incubar en hielo por 5 min. e inmediatamente incubar a 42°C por 30 segundos.

7) Transferir el vial a una cuba con hielo y adicionar 250 μ L de medio S.O.C.

8) Incubar a 37°C, 200 rpm por 1 hr.

9) Centrifugar a 6,000 rpm a 4°C por 10 min. y retirar el volumen necesario para resuspender el pellet celular en 100 μ L del sobrenadante.

10) Esparcir 50 μ L de la suspensión celular en dos placas de medio LB con 50 μ g/mL kanamicina.

11) Incubar toda la noche a 37°C, se espera 100 colonias como mínimo.

SELECCIÓN.

12) Subcultivar de 2 a 6 colonias positivas en caldo LB con 50 μ g/mL de kanamicina, a 37°C y 180rpm durante 8 hrs.

13) Mezclar 900 μ L del cultivo con 100 μ L de glicerol al 80%, invertir varias veces y guardar a -70°C.

AISLAMIENTO DEL PLASMIDO.

13) Se utilizó el kit Miniprep, QIAGEN, siguiendo las instrucciones del proveedor.

SECUENCIACIÓN.

14) El vector se linearizó utilizando la enzima de restricción PstI, condiciones de la reacción de digestión: 5 U/reacción, 37°C por 2 hrs. Inactivación: 80°C por 20 min.

15) El cebador empleado para secuenciar fue el T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3').

8. Patrones de migración.

Para emplear esta estrategia como método de identificación, primeramente, se realizó la activación de 24 de los aislados conservados en perlas de vidrio horadadas por la Q.A. Amanda Bravo y la pas. de Q.A Linda Cortés.

De estos aislados 18 se obtuvieron a partir de la muestra A1 con 76 días de maduración (t3) y 6 aisladas a partir de la muestra A2 con 73 días de maduración (t3), ambas a partir de la dilución 10E-3. Se eligieron estos tiempos de maduración por que la cuenta de coliformes era prácticamente cero, lo que aumentaba la probabilidad de que las bacterias detectadas fueran parte de la microbiota colonizadora deseable (Figura 5). La identidad de estos aislados era indeterminada, sin embargo se esperaba que de acuerdo al medio selectivo en el que fueron aislados pertenecieran a los géneros *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *S. thermophilus* (Tabla XI).

Tabla XI. Información de los aislados obtenidos a partir de la muestra A1			
Medio	Selectivo para:	Condiciones	No. de aislados
KAA	<i>Enterococcus</i>	37°C 24 hrs.	1,2,3,4,5,6,7,8,9 y 10
MRS + V	<i>Leuconostoc</i>	30°C 3 días	8
LM17 22°C	<i>Lactococcus</i>	22°C 3 días	1 y 4
LM17 37°C	<i>S. thermophilus</i>	37°C 2 días	1,3,5b,9 y 10
Información de los aislados obtenidos a partir de la muestra A2			
KAA	<i>Enterococcus</i>	37°C 24 hrs.	2,3,4,5,6 y 9

La activación se hizo inoculando una perla de vidrio horadada en 5 mL de caldo APT en un tubo falcon de 15 mL, las condiciones de incubación fueron 37°C por 48 hrs a 250 rpm. A las 8 hrs. de incubación se realizó el frotis y la tinción de Gram para confirmar pureza. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró la chaquiras con un asa estéril y se centrifugó a 3600 rpm durante 15 min. El pellet resultante, se lavó (resuspendido en 500 μ L de buffer PBS y centrifugado a 3600 rpm durante 15 min) dos veces. Terminado el lavado, el pellet se resuspendió en 150 μ L de buffer PBS y la suspensión resultante se transvasó a un microtubo de 1.5 mL, y se siguió el protocolo de **extracción del material genético**, que se describe a continuación:

1) Adicionar lisozima en polvo (la punta de una espátula), agitar vigorosamente e incubar a 37°C por 30 min. a 800 rpm, terminado el tiempo se agrega 20 μ L de RNAsa (10 μ g/mL), y se continúa con la incubación por 30 min. más.

2) Agregar 10 μ L de proteinasa K (20 μ g/mL), agitar e incubar en hielo por 5 min.

3) Adicionar 10 μ L de SDS al 10% e incubar por 40 min a 37°C y 800 rpm.

4) Adicionar 200 μ L de NaCl 5M (la adición de SDS y NaCl, es para desestabilizar los agregados proteicos y conferir carga, respectivamente, lo cual hace eficiente la remoción de proteínas durante la extracción con fenol-cloroformo.

5) Adicionar 800 μ L de la solución fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1), en la campana.

6) Agitar en el vortex vigorosamente por aproximadamente 15 min, de esto depende la remoción de las proteínas.

7) Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min. Recuperar la fase acuosa sin tocar la interfase y transferirla a un microtubo de 2 mL limpio.

8) Repetir la extracción (pasos 5-7) hasta que la interfase (proteínas) sea nula.

9) Transferir la fase acuosa a un microtubo de 2 mL limpio.

10) Adicionar 2 volúmenes de etanol al 100% (v/v) a -20°C e incubar a la misma temperatura por 1 hr, ya que de esta manera se favorece la precipitación del ADN.

11) Centrifugar a 13,000 rpm durante 20 min., lavar el precipitado con 1 mL de etanol al 75% (v/v) dos veces, dejar que el etanol remanente se evapore a T amb.

12) Resuspender el pellet en 100 μ L de buffer TE, pH 8.

13) Almacenar a 4°C.

En este procedimiento la lisis celular se hizo enzimáticamente por acción de la lisozima, la remoción de contaminantes fue por la acción de la proteinasa K, la RNAsa y la extracción con fenol-cloroformo, la cual permite separar a las proteínas del ADN, la recuperación del ADN se hizo por precipitación.

Se cargaron 8 μ L del ADN total en un gel de agarosa al 1.5% (p/v), que contenía 1 μ g/mL de BrEt, se corrió por 45 min. a 100 V. La visualización se hizo en el transiluminador UV (ColePalmer). Además se determinó la pureza y cantidad del ADN total por el método espectrofotométrico 260/280, así como el espectro de absorción de la muestra en un barrido de 300-200 nm.

Una vez que se comprobó la integridad y pureza del ADN total, de cada uno de los 24 aislados, se llevó a cabo la **amplificación de la región V3 del gene ADNr 16S** utilizando los cebadores Agc338F y B518R, condiciones y mezcla de reacción, descritas en las Tablas VIII y IX.

Para conocer la posición que ocupa el amplicón de cada uno de los aislados, y que de esta forma sirvan como patrones de migración, se cargaron 3 μ g en un DGGE-paralelo 30-70% desnaturizante.

Después de analizar y agrupar las bandas que tenían la misma posición en el gel desnaturizante, se procedió a cortar las bandas de interés directamente del gel y se continuó con el tratamiento descrito en el apartado 6 de esta sección. Cumpliendo con ello el objetivo de esta estrategia, clasificar a los aislados dentro de un género y determinar su posición de migración en el gel desnaturizante.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

RETO 1: Obtener ADN de la microbiota colonizadora directamente del alimento, para la amplificación de la región V3 del gene ADNr 16S.

La calidad del material genético extraído de la microbiota colonizadora a partir de las muestras A1, A2 y NoA, se determinó mediante el **índice de pureza** (260/280nm), cuyo valor comúnmente obtenido para el ADN proveniente directamente de matrices complejas es de ≥ 1.2 , característica que se observó en la mayoría de las muestras. El índice de pureza obtenido para los amplicones en la mayoría de los casos tiene un valor cercano a 2, lo que indica una presencia mínima de proteínas en relación a la cantidad amplificada de ADN, por lo que su pureza es mayor (Tabla XII).

Para corroborar la calidad del ADN extraído se realizó para cada una de las muestras un barrido de 300-200nm, en el **espectro de absorción** resultante se observan líneas definidas sin ruido, con un máximo a 260nm (longitud de absorción de los ácidos nucleicos). En la Figura 14 se muestran algunos ejemplos.

La **visualización** del ADN total es otra manera de comprobar la buena calidad del material extraído, esto es observando una banda intensa y bien definida sin el barrido característico que indica degradación, pero debido a la baja concentración del ADN extraído, no se logró visualizar mediante la tinción con BrEt cuyo límite de detección es de 1 ng de ADN, se recomienda utilizar una tinción más sensible como el SYBR Green I que detecta hasta 60 pg de ADN (Sigma-Aldrich).

Tabla XII. Determinación concentración y pureza del ADN total extraído de las muestras de queso y los amplicones.							
Descripción y localización de las muestras				ADN _{TOTAL}		Amplicón	
No. carril	Tiempo de maduración (días)	Muestra	Símbolo	260/280nm	μg ADN/mL	260/280nm	μg ADN/mL
1	15	A2	t ₀	1.180	22.1	1.437	306.8
2	22	NoA	t ₀	1.215	33.1	1.740	429.2
3	18	A1	t ₀	1.222	51.6	1.581	464.9
4	33	A2	t ₁	1.148	65.5	1.725	486.7
5	40	NoA	t ₁	1.227	44.1	1.745	482.4
6	36	A1	t ₁	1.225	55.8	1.699	494.1
7	53	A2	t ₂	1.012	19.3	2.080	453.3
8	60	NoA	t ₂	1.344	18.6	1.773	489.5
9	56	A1	t ₂	1.069	15.8	1.693	447.4
10	73	A2	t ₃	0.916	32.1	1.8	1139
11	80	NoA	t ₃	1.20	14.3	1.8	1208
12	76	A1	t ₃	1.25	42.5	1.8	1095
13	96	A2	t ₄	0.858	82.8	1.7	1176
14	103	NoA	t ₄	1.10	40.7	1.8	1127
15	99	A1	t ₄	0.77	32.3	1.9	1140
16	134	A2	t ₅	1.09	12.3	1.8	1066
17	141	NoA	t ₅	1.01	10.6	1.8	1179
18	137	A1	t ₅	1.54	12.9	1.8	977
19	166	A2	t ₆	1.01	26.3	1.8	1302
20	173	NoA	t ₆	1.20	11.5	1.8	989
21	169	A1	t ₆	1.18	6.8	1.8	1215
22	207	A2	t ₇	0.985	39.6	1.7	1030
23	214	NoA	t ₇	1.25	46.6	1.9	1215
24	210	A1	t ₇	1.35	63.0	2	1148
25	235	A2	t ₈	1.4	25.6	1.8	1130
26	242	NoA	t ₈	1.4	11.6	1.9	1299
27	238	A1	t ₈	1.4	40.8	1.7	1004
28	-----	cuajada _{A1}	---	0.844	48.1	1.9	994
29	-----	chiapas	---	1.22	60.2	1.8	1214

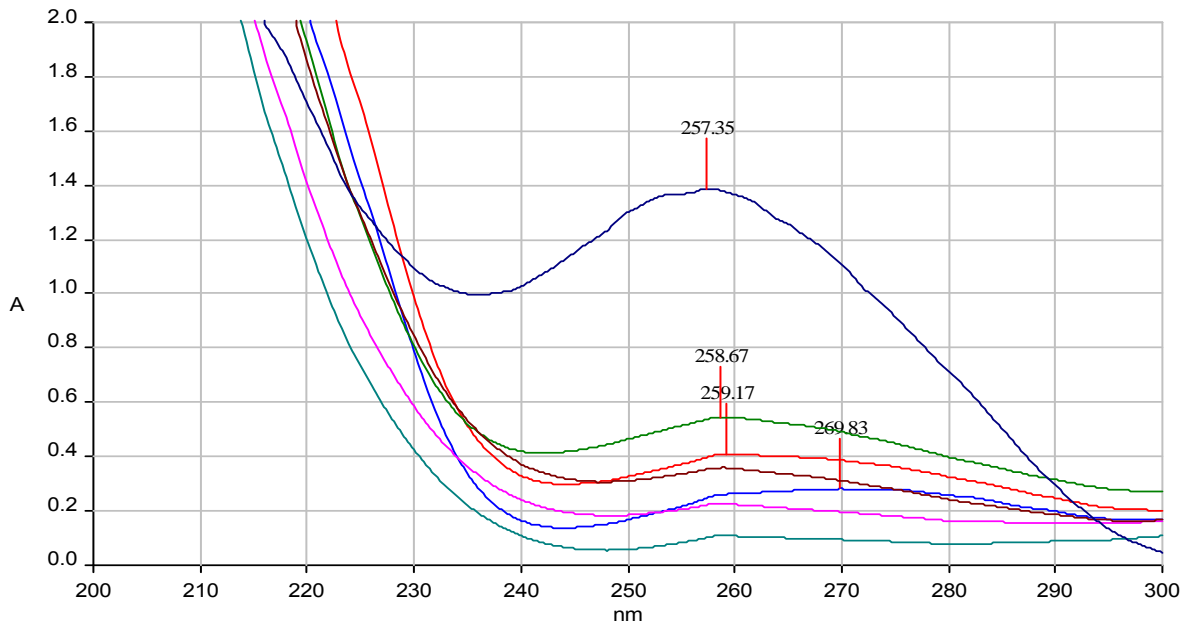


Figura 14. Espectro de absorción para A2;t₇ (azul), NoA;t₇ (naranja), A1;t₇ (verde), A2;t₈ (rosa), NoA;t₈ (verde), A1;t₈ (café) y el control timo de ternero (negro), en un barrido de 300 – 200 nm.

En cuanto a los amplicones, el tamaño esperado de 253pb fue el observado (Figura 15-16), la cuantificación (Tabla XII) es necesaria, por que permite cargar concentraciones iguales en el DGGE-perpendicular y paralelo, lo que asegura que la mayor o menor intensidad de las bandas obtenidas no sea debida a variantes de la concentración de carga en el gel. Por otra parte, el que se pudiera llevar a cabo la amplificación es otro indicativo de la calidad y pureza del material genético extraído, ya que como se sabe en los alimentos existen una gran variedad de inhibidores de la PCR como compuestos fenólicos, glucógeno, proteínas, grasas, Ca^{2+} , entre otros, siendo estos 3 últimos los que pudieran interferir en las muestras de este estudio (Wilson, 1997).

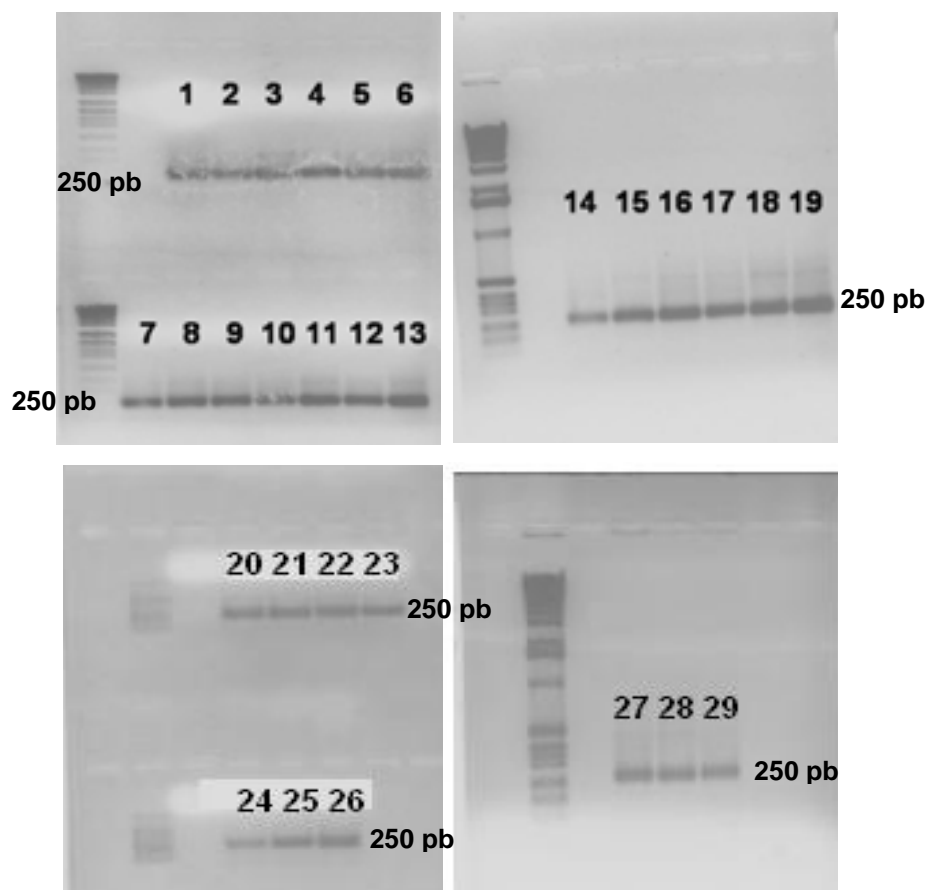


Figura 15-16. Amplicones de las muestras cuajada (1), A1 (2-10), A2 (11-19), NoA (20-28) de tiempos de maduración 0 - 8 y chiapas (29). Gel de agarosa al 2% (p/v) con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BrEt, Vol. carga: 8 μL de una reacción de 200ng molde. Marcador O' Range Ruler 50pb DNA Ladder.

RETO 2: Determinar el gradiente desnaturalizante óptimo para separar los amplicones.

A partir del DGGE-perpendicular (Figura 17) se calculó el gradiente desnaturalizante a emplear en la siguiente etapa de separación de la mezcla de amplicones mediante el DGGE-paralelo. El cálculo se hizo trazando sobre el gel una escala cuyo límite inferior y superior corresponden a 20 y 70% desnaturalizante, respectivamente, después situándonos en la escala se trazó una línea paralela a los puntos donde inicia (25%) y donde termina (60%) la sigmoide o zona de desnaturalización, para la región V3 del gene ADNr 16S de las comunidades bacterianas en estudio.

De esta manera el intervalo desnaturalizante óptimo fue de 25%-60%, sin embargo después de realizar y ver los resultados de un DGGE paralelo preliminar (Figura 18), la presencia de la bandas gruesas al final de los carriles y la ausencia de bandas al inicio del gel, fueron detalles que sugerían un intervalo desnaturalizante inadecuado, por lo que se probó un intervalo de 30%-70% (Figura 19), lo que permitió visualizar un mayor número de bandas y mejorar la resolución, lo que evidencia la importancia de optimizar el gradiente desnaturalizante, ya que de éste depende la claridad y resolución de los patrones de bandas.

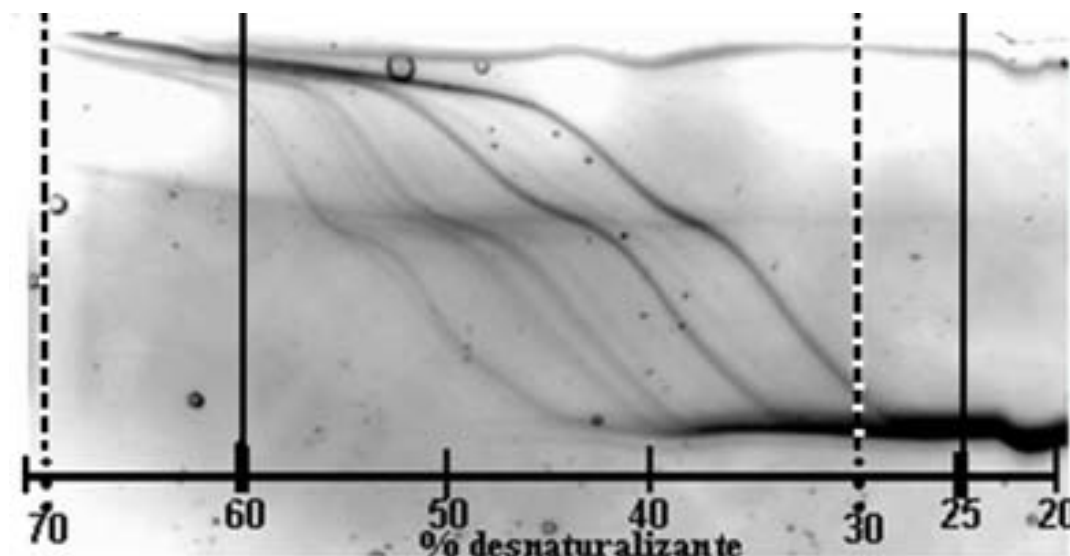


Figura 17. DGGE-perpendicular. Gel de poliacrilamida al 8% con gradiente desnaturalizante 20%-70%. Teñido con solución BrEt (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Vol. carga: una mezcla de 180 μL .

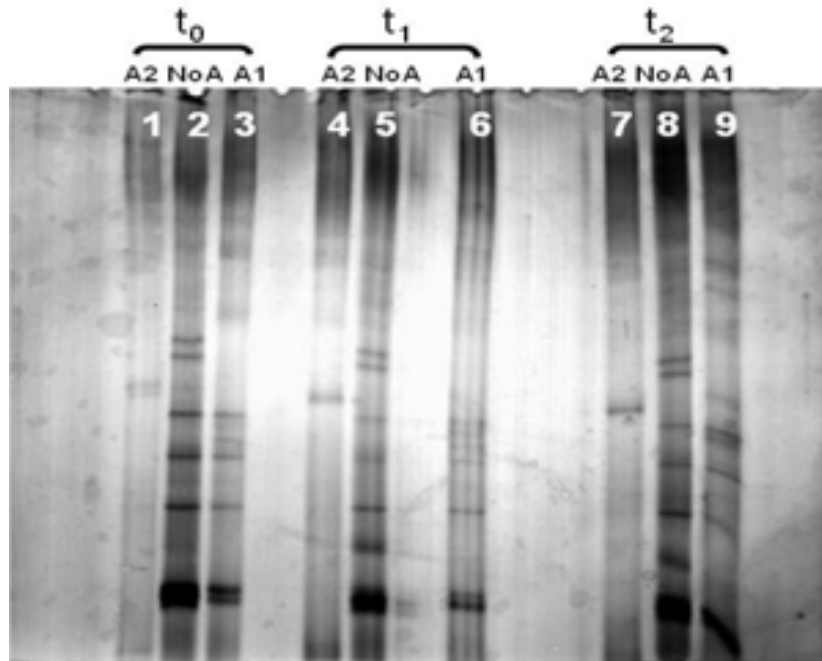


Figura 18. Separación de los amplicones en un DGGE-paralelo de las muestras A2, NoA y A1 en los tiempos de maduración t_0 , t_1 y t_2 , carril 1, 4 y 7; 2, 5 y 8; 3, 6 y 9, respectivamente. Gel de poliacrilamida al 8% con gradiente desnaturizante 25%-60%. Teñido con plata. En todos los carriles se adicionaron 300 ng de ADN.

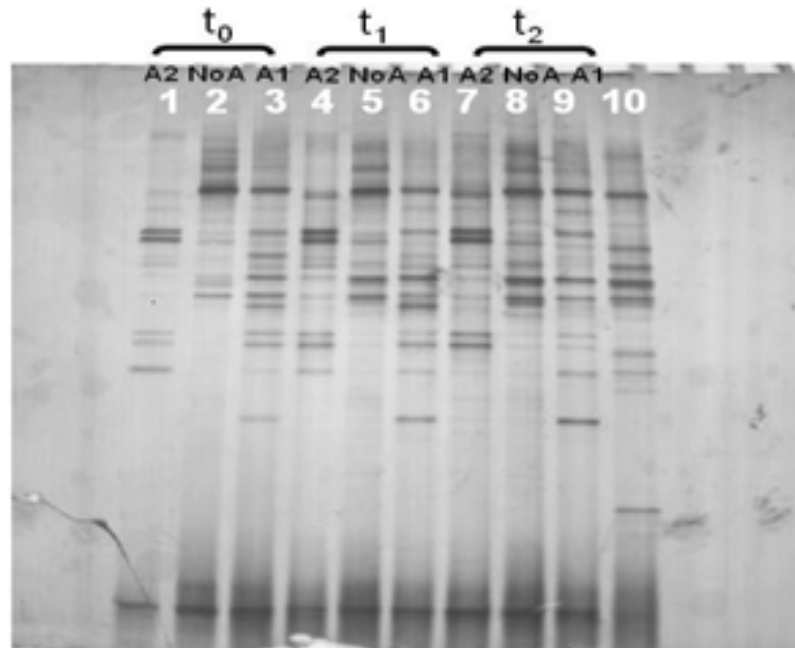


Figura 19. Separación de los amplicones en un DGGE-paralelo de las muestras A2, NoA y A1 en los tiempos de maduración t_0 , t_1 y t_2 , carril 1, 4 y 7; 2, 5 y 8; 3, 6 y 9, respectivamente. El carril 10 corresponde a una muestra de otro estudio. Gel de poliacrilamida al 8% con gradiente desnaturizante 30%-70%. %. Teñido con plata. En todos los carriles se adicionaron 300ng de ADN.

El PCR-DGGE es una técnica altamente reproducible (Ferrari & Hollibaugh, 1999, Murray *et al.*, 1996, Muyzer, 1999, Ovreas *et al.*, 1997, Riemann *et al.*, 1999) hecho que se observó (Figura 20) al comparar los patrones de migración en el DGGE-paralelo de los amplicones obtenidos apartir de dos reacciones de amplificación independientes utilizando como ADN patrón el proveniente de una extracción común.

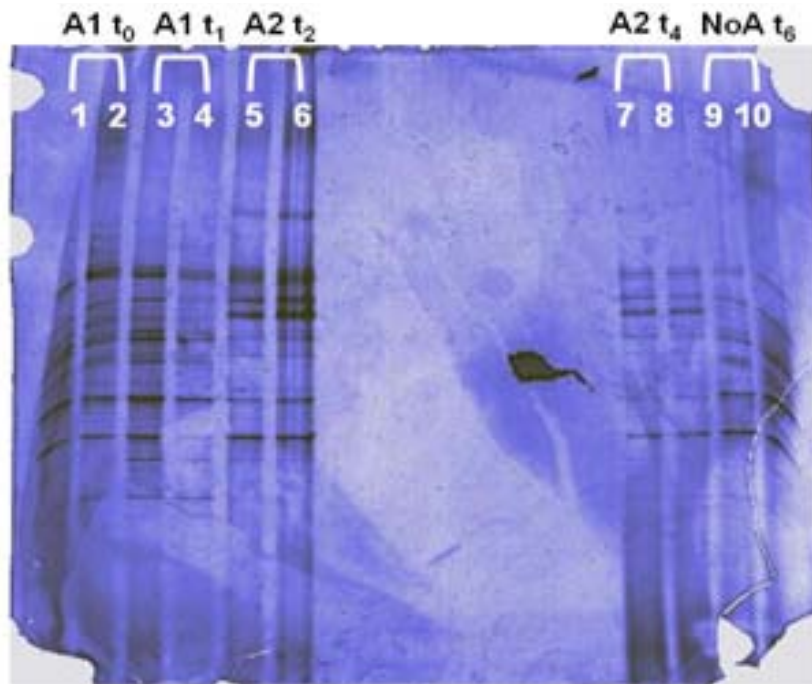


Figura 20. Reproducibilidad del patrón de migración de los amplicones en un DGGE-paralelo. Los carriles enlazados corresponden a los amplicones obtenidos de las muestras A1 t_0 y t_1 , A2 t_2 y t_4 , NoA t_6 , en reacciones de amplificación independientes. Gel de poliacrilamida al 8% con gradiente desnaturizante 30%-70%. Teñido con plata. En cada carril se adicionó 300 ng de ADN.

RETO 3: Obtener la huella génica para A1, A2, NoA, cuajada y chiapas.

En la huella génica (Figuras 21, 22 y 23) de las muestras A1, A2 y NoA, cada columna corresponde a un tiempo de maduración y microambiente específico diferente; por ejemplo; Bravo, (2008) en su trabajo determinó para la muestra A1 a los 20 días de maduración un pH de 5.83 que 18 días después disminuyó a 5.41. (Ver los resultados en la Figura 5).

En éstas se observan, como resultado de la separación de los amplicones obtenidos en A1, A2 y NoA, 25, 21 y 15 bandas, respectivamente, las que representan a los individuos de la comunidad bacteriana del queso Cotija que pudieron ser lisados y cuyo material genético logró ser amplificado en cantidades superiores al límite de detección del DGGE. Cabe señalar que la cantidad puede ser influenciada por la amplificación preferencial, descrita en el apartado 7 de la INTRODUCCIÓN.

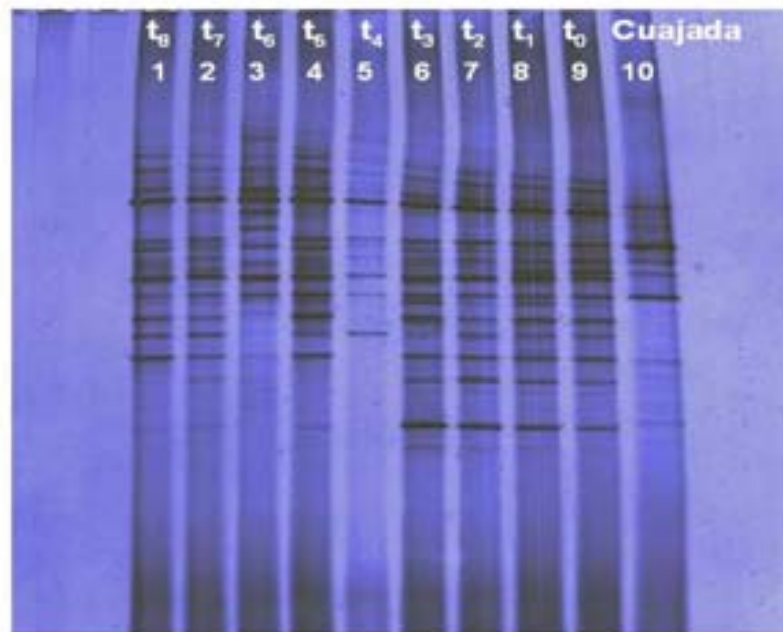


Figura 21. Separación de los amplicones en un DGGE-paralelo de la muestra A1 del t_8 al t_0 de maduración (carril 1-9) y la cuajada (carril 10). Gel de poliacrilamida al 8% con gradiente desnaturante 30%-70%. Teñido con plata. En todos los carriles se adicionaron 300 ng de ADN.

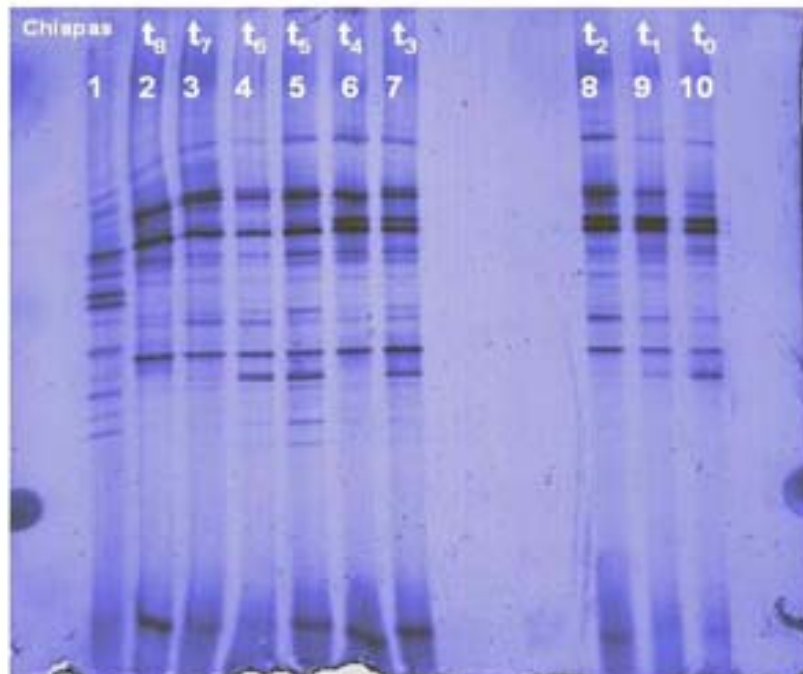


Figura 22. Separación de los amplicones en un DGGE-paralelo de la muestra A2, del t_8 al t_0 de maduración (carril 2-10) y una muestra procedente de chiapas (carril 1). Gel de poliacrilamida al 8% con gradiente desnaturizante 30%-70%. Teñido con plata. En todos los carriles adicionaron 300 ng de ADN.

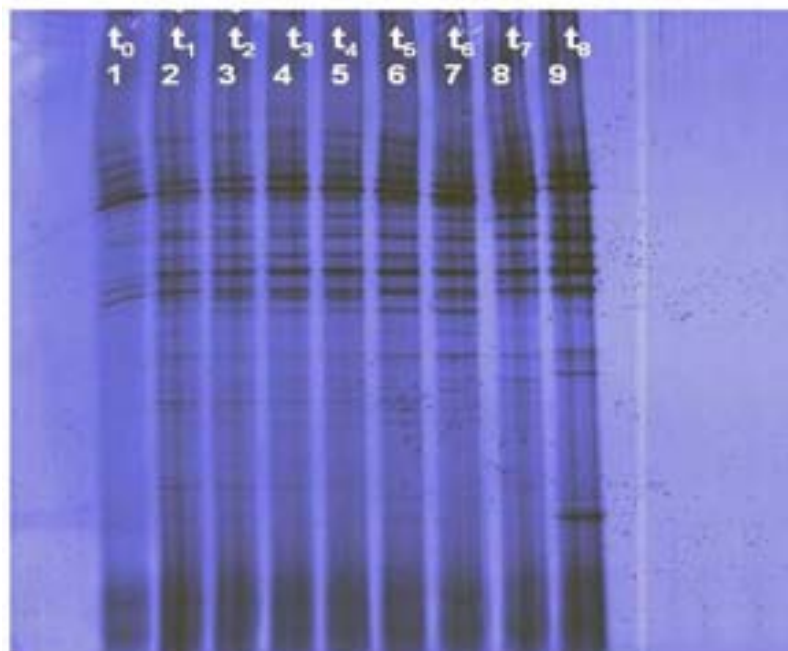


Figura 23. Separación de los amplicones en un DGGE paralelo de la muestra NoA, del t_0 al t_8 de maduración (carril 1-9). Gel de poliacrilamida al 8% con gradiente desnaturizante 30%-70%. Teñido con plata. En todos los carriles se adicionaron 300 ng de ADN.

Las huellas génicas de cada muestra, fueron digitalizadas para su análisis y corresponden a las Figuras 24, 25 y 26.

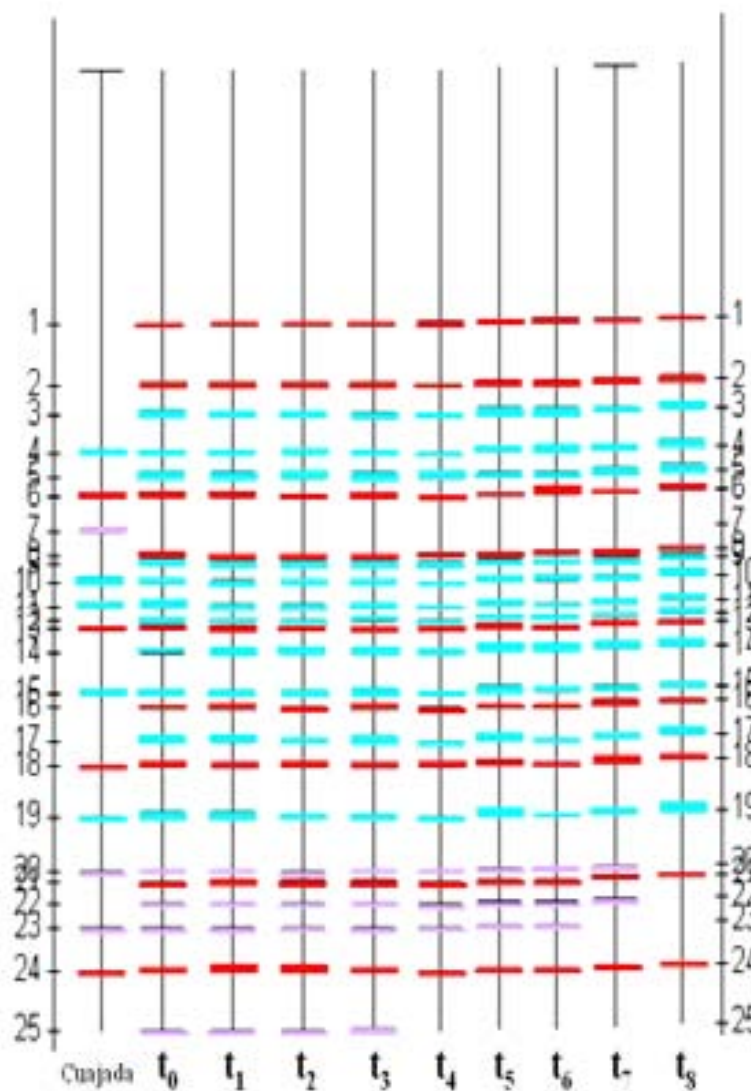


Figura 24. Digitalización de la huella génica **muestra A1**, consta de 10 columnas que corresponden de izquierda a derecha a la cuajada (antes de salar), t_0 18 días, t_1 36 días, t_2 56 días, t_3 76 días, t_4 99 días, t_5 137 días, t_6 169 días, t_7 210 días y t_8 238 días.

CODIGO DE COLORES, correspondiente al descrito en la pág. 70 y Tabla XXI.		
Color	Categoría	Descripción
Cian	I	Población dominante detectable durante los 7 meses de la maduración.
Rojo	II	Población no dominante detectable durante los 7 meses de la maduración.
Verde	III	Población dominante detectable en etapas posteriores al inicio de la maduración.
Azul	IV	Población no dominante detectable en etapas posteriores al inicio de la maduración.
Morado	V	Población no dominante inhibida al final de la maduración.

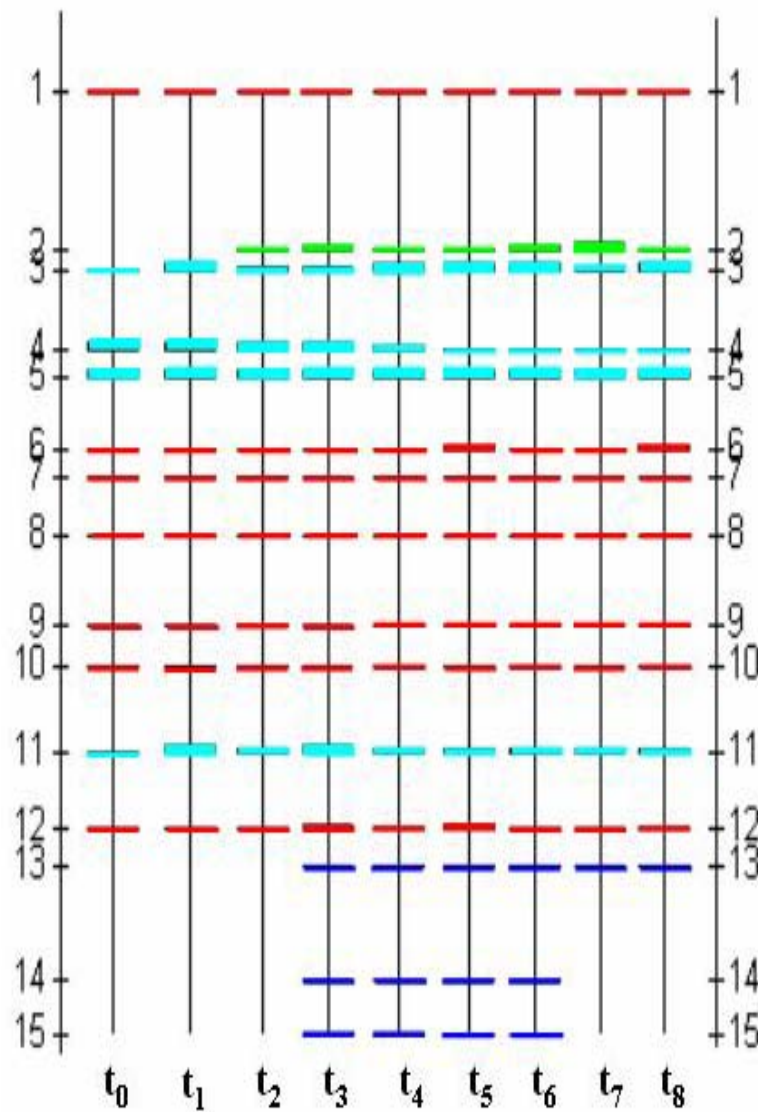


Figura 25. Digitalización de la huella génica **muestra A2** consta de 9 columnas que corresponden de izquierda a derecha al, t_0 15 días, t_1 33 días, t_2 53 días, t_3 73 días, t_4 96 días, t_5 134 días, t_6 166 días, t_7 207 días y t_8 235 días.

CODIGO DE COLORES, correspondiente al descrito en la pág. 70 y Tabla XXI.		
Color	Categoría	Descripción
Cian	I	Población dominante detectable durante los 7 meses de la maduración.
Rojo	II	Población no dominante detectable durante los 7 meses de la maduración.
Verde	III	Población dominante detectable en etapas posteriores al inicio de la maduración.
Azul	IV	Población no dominante detectable en etapas posteriores al inicio de la maduración.
Morado	V	Población no dominante inhibida al final de la maduración.

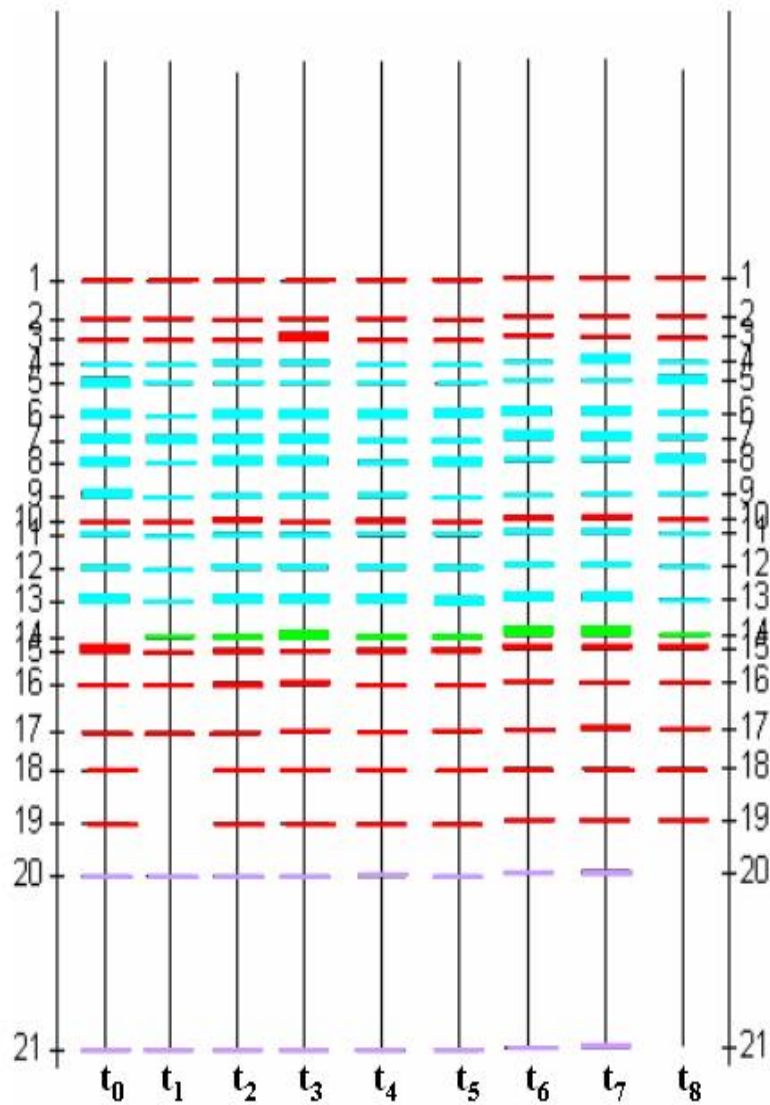


Figura 26. Digitalización de la huella génica **muestra NoA** consta de 9 columnas que corresponden de izquierda a derecha al, t_0 22 días, t_1 40 días, t_2 60 días, t_3 80 días, t_4 103 días, t_5 141 días, t_6 173 días, t_7 214 días y t_8 242 días.

CODIGO DE COLORES, correspondiente al descrito en la pág. 70 y Tabla XXI.		
Color	Categoría	Descripción
Cian	I	Población dominante detectable durante los 7 meses de la maduración.
Rojo	II	Población no dominante detectable durante los 7 meses de la maduración.
Verde	III	Población dominante detectable en etapas posteriores al inicio de la maduración.
Azul	IV	Población no dominante detectable en etapas posteriores al inicio de la maduración.
Morado	V	Población no dominante inhibida al final de la maduración.

OBJETIVO 1: Análisis global de las poblaciones bacterianas.

Diversidad bacteriana.

En el análisis global, en cuanto a la **diversidad** microbiana en las muestras de estudio, se distinguieron tres tipos de comunidades colonizadoras, de acuerdo con su comportamiento ante los cambios globales de su microambiente (Tabla XIII).

Tabla XIII. Cambios graduales en el microambiente del queso Cotija durante su maduración.										
Parámetros fisicoquímicos	A1					A2				
	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
pH	5.83	5.41	5.53	5.57	5.4	5.89	5.33	5.31	5.32	5.25
% Ácido láctico	0.303	0.257	0.257	0.255	0.290	0.310	0.297	0.293	0.397	0.337
a _w	0.914	0.890	0.883	0.872	0.787	0.915	0.911	0.904	0.899	0.887

(Bravo, 2008).

A continuación se describen los tres tipos de comportamiento (Tabla XIV): **Sin alteración** cuando el tamaño aparente de la población que puede ser detectada en el DGGE, se mantiene desde el inicio, ya sea la cuajada o el t₀, hasta el final de la maduración (t₈), **Inhibidos** cuando el microorganismo muere y su concentración con respecto a los demás disminuye hasta por debajo del límite de detección, 1-2% de la población relativa (MacNaughton *et al.*, 1999) y **Favorecidos**, esto es que el microorganismo permaneció en la muestra a concentraciones por debajo del límite de detección hasta que las condiciones del microambiente permitieron su desarrollo y por ende su detección (Ver Figuras 24,25 y 26).

Tabla XIV. Diversidad de la comunidad bacteriana en el Cotija y su comportamiento durante 7 meses de maduración.			
Efecto en el desarrollo	No. Bandas	Población (%)	No. de referencia de Individuo (banda)
MUESTRA A1			
Sin alteración	20	80	1-6, 8-19, 21 y 24
Inhibidos	5	20	7, 20, 22-23 y 25
Favorecidos	0	0	-----
Total	25	100	
MUESTRA A2			
Sin alteración	11	74	1 y 3-12
Inhibidos	0	0	-----
Favorecidos	4	26	2 y 13-15
Total	15	100	
MUESTRA NoA			
Sin alteración	18	86	1-13, 15-19
Inhibidos	2	9	20 y 21
Favorecidos	1	5	14
Total	21	100	

Nota: Se considera que los individuos 18 y 19 de la muestra NoA (Figura 26) se comportan como **Sin alteración** a pesar de que en el t1 no se detectó su presencia. En cuanto a los individuos 14 y 15 de la muestra A2 (Figura 25) se consideran como **favorecidos** a pesar de su posterior inhibición.

En las tres muestras analizadas el porcentaje de individuos que mantuvieron su concentración de biomasa inicial y que continuaron desarrollándose a pesar de los cambios de su microambiente fueron la mayoría, esto es, el 86, 80 y 74 % en NoA, A1 y A2, respectivamente.

En la muestra A1 se presentó el mayor porcentaje de individuos inhibidos (20%), mientras que en la muestra A2 esta inhibición no se observó. En cuanto a la población que vio favorecido su desarrollo la muestra A2 presentó el 26%, seguido por el 5% observado en NoA y el 0% en A1.

Por lo que en la muestra A1 pareciera que el microambiente es más estresante, en comparación con el microambiente de la muestra A2, probablemente debido a una mayor disminución en el valor de a_w (ver Tabla XIII).

La banda 4 de la muestra A2 y la banda 8 de la muestra A1, tienen la misma posición de 0.32 (ver escala en la Figura 30). La secuencia contenida en dichas bandas fueron clasificadas dentro del género *Vagococcus* (ver Tabla XXIX). Partiendo de esta información, como se vera más adelante en el apartado dominancia relativa, el carácter dominante de la banda 4 en la muestra A2 (Figura 28) y el comportamiento no dominante de la banda 8 en la muestra A1 (Figura 27), sugieren que efectivamente este último microambiente es más estresante por lo menos para el género *Vagococcus*.

Que el microambiente sea propicio o no para el desarrollo de los individuos colonizadores, podría ser una ventaja o desventaja, dependiendo de la función que desempeñen en el queso Cotija. Por ejemplo, que el microambiente de la muestra A2 favoreciera el desarrollo de la bacteria representada por la banda 14 en etapas posteriores al inicio de la maduración en lugar de inhibirlo, representa una ventaja (ver Figura 25 y Tabla XIV) ya que como se vera más adelante, la secuencia contenida en la banda 14 posición 0.62 (ver escala en la Figura 30) fue clasificada como *E. faecium* IDCC2104, cepa reconocida por su potencial comportamiento probiótico (Kwon *et al.*, 2007, sin publicar).

Dinámica bacteriana.

En cuanto a la **dinámica del desarrollo** bacteriano (Tabla XV), se pueden distinguir dos tipos de población, por la ausencia o presencia de bandas en los diferentes tiempos de maduración; así la población **constante** presente desde el inicio de la maduración (t_0) y que se mantuvo hasta el final (t_3), corresponde a la mayoría de los individuos: 86, 84 y 73% en NoA, A1 y A2, respectivamente. Mientras que la población **variable**, que se presenta sólo en un periodo de la maduración, representa el 27% en A2, 16% en A1 y 14% en NoA. La banda 7 de la muestra A1 no se consideró para esta clasificación, porque sólo está presente en la cuajada (Figuras 24, 25 y 26).

Tabla XV. Dinámica de la población bacteriana durante 7 meses de maduración.			
Detección	No. Bandas	Población (%)	No. de referencia de Individuo (banda)
MUESTRA A1			
Constante	20	84	1-6, 8-19, 21 y 24
Variable	4	16	20, 22, 23 y 25
Total	25	100	
MUESTRA A2			
Constante	11	73	1 y 3-12
Variable	4	27	2 y 13-15
Total	15	100	
MUESTRA NoA			
Constante	18	86	1-13 y 15-19
Variable	3	14	14 y 20-21.
Total	21	100	

Nota: Se considera que los individuos 18 y 19 de la muestra NoA se comportan como **constantes** a pesar de que en el t_1 no se detectó su presencia.

Como caso particular para la muestra A1, se analizó una cuajada proveniente de la misma ranchería, por lo que consideramos que la población identificada puede verse desde el punto de vista antes y después del salado (Tabla XVI), así el 44% de la población está presente desde etapas previas al salado y es capaz de mantenerse durante los 7 meses de la maduración en concentraciones elevadas de sal, 4 – 7.4% y a_w bajo, 0.9-0.86 (Hernández, 2007b), a diferencia de la banda 7 que no fue capaz de permanecer. Por otro lado, es importante resaltar que el 52% de la población no se detecta en la cuajada, lo que sugiere que el salado y etapas posteriores como el oreado tienen la capacidad de seleccionar e incorporar un poco más de la mitad de la diversidad microbiana. Es importante para respaldar la propuesta realizar estudios enfocados en la microbiología de la sal de mar e importancia del salado en la microbiota del auténtico queso Cotija.

Tabla XVI. Dinámica de la población bacteriana para la muestra A1 considerando la cuajada durante 7 meses de maduración.			
Detección	No. Bandas	Población (%)	No. de referencia de Individuo (banda)
Cuajada	1	4	7
Antes de salar	11	44	4, 6, 10-11, 13, 15, 18-20, 23 y 24.
Después de salar	13	52	1-3, 5, 8-9, 12, 14, 16-17 21-22 y 25.
Total	25	100	

Dominancia relativa.

En el DGGE la intensidad relativa de las bandas puede estar relacionada directamente con la dominancia relativa del filotipo bacteriano presente en la muestra (Muyzer *et al.*, 1995; Van Hannen *et al.*, 1999).

La intensidad relativa (Tablas XVII, XVIII y XIX) de cada banda en el gel es un dato que proporciona el software Diversity Date Base, por lo que es factible diferenciar a la población dominante de cada muestra, una vez establecido el criterio de selección. El dominio relativo de un individuo (DR) es la suma de la intensidad relativa promedio (IRp) de cada una de las bandas, dividida entre el número de individuos que conforman la comunidad bacteriana de cada muestra. Este parámetro permite clasificar a los individuos de cada muestra en dominantes ($IRp \geq DR$) y no dominantes ($IRp \leq DR$) (Figuras 27, 28 y 29).

Como tal, el valor promedio de la intensidad relativa (IRp) de cada banda podría relacionarse con la biomasa y la desviación estándar (desv. est.), sería un indicativo de susceptibilidad ante los cambios graduales de su microambiente.

Así, por citar algunos ejemplos, para la muestra A1 las bandas 23 y 16 corresponden a individuos no dominantes (ver Tabla XVII), siendo la banda 16 más susceptible, porque la desv. est. es mayor. En el caso de individuos dominantes en la muestra A2 la banda 4 es más susceptible que la banda 5 (ver Tabla XVIII).

Tabla XVII. Intensidad relativa de cada uno de los individuos presentes en A1.

No de referencia. de individuo	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	IRp \pm desv. est.
1	0.34	0.31	0.27	0.25	0.25	0.32	0.39	0.31	0.28	0.30 \pm 0.05
2	0.63	0.53	0.51	0.38	0.26	0.61	0.44	0.28	0.53	0.46 \pm 0.13
3	0.81	0.43	0.60	0.46	0.26	0.71	0.43	0.46	0.60	0.53 \pm 0.17
4	0.69	0.63	0.64	0.61	0.22	0.76	0.82	0.45	0.66	0.61 \pm 0.18
5	0.96	0.97	0.98	0.93	0.88	0.79	0.77	0.96	0.80	0.89 \pm 0.09
6	0.55	0.51	0.40	0.41	0.19	0.44	0.80	0.35	0.36	0.45 \pm 0.17
7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.47
8	0.45	0.43	0.32	0.28	0.16	0.37	0.65	0.30	0.31	0.36 \pm 0.14
9	0.82	0.82	0.75	0.71	0.3	0.81	0.33	0.60	0.63	0.64 \pm 0.20
10	0.58	0.55	0.51	0.60	0.28	0.79	0.68	0.43	0.64	0.56 \pm 0.15
11	0.84	0.78	0.68	0.55	0.22	0.60	0.24	0.55	0.53	0.55 \pm 0.21
12	0.82	0.56	0.45	0.84	0.18	0.61	0.53	0.6	0.58	0.58 \pm 0.20
13	0.80	0.84	0.37	0.47	0.16	0.61	0.34	0.3	0.49	0.49 \pm 0.23
14	0.82	0.92	0.90	0.91	0.37	0.88	0.85	0.88	0.82	0.82 \pm 0.17
15	0.76	0.74	0.63	0.83	0.24	0.87	0.66	0.61	0.54	0.65 \pm 0.19
16	0.37	0.63	0.31	0.85	0.14	0.54	0.31	0.35	0.37	0.43 \pm 0.21
17	0.80	0.85	0.55	0.91	0.14	0.85	0.19	0.29	0.74	0.59 \pm 0.31
18	0.54	0.51	0.54	0.42	0.39	0.54	0.18	0.67	0.61	0.49 \pm 0.14
19	0.80	0.82	0.74	0.79	0.13	0.77	0.25	0.59	0.76	0.63 \pm 0.26
20	0.35	0.28	0.56	0.38	0.13	0.24	0.32	0.33	-----	0.32 \pm 0.12
21	0.28	0.69	0.71	0.99	0.14	0.26	0.24	0.32	0.26	0.43 \pm 0.29
22	0.27	0.30	0.29	0.32	0.13	0.23	0.23	0.25	-----	0.25 \pm 0.06
23	0.23	0.25	0.24	0.31	0.14	0.24	0.24	-----	-----	0.24 \pm 0.05
24	0.64	0.76	0.79	0.85	0.14	0.34	0.23	0.31	0.29	0.48 \pm 0.27
25	0.26	0.30	0.29	0.47	-----	-----	-----	-----	-----	0.33 \pm 0.09

Dominio relativo: 0.50 \pm 0.16

Tabla XVIII. Intensidad relativa de cada uno de los individuos presentes en A2.

No de referencia. de individuo	t0	t1	t2	T3	t4	t5	t6	t7	t8	IRp \pm desv. est.
1	0.12	0.15	0.40	0.21	0.31	0.22	0.12	0.20	0.12	0.21 \pm 0.10
2	-----	-----	0.48	0.41	0.20	0.46	0.21	0.60	0.28	0.38 \pm 0.15
3	0.31	0.44	0.60	0.60	0.74	0.78	0.46	0.64	0.24	0.53 \pm 0.19
4	0.79	0.75	0.84	0.67	0.78	0.34	0.13	0.30	0.38	0.55 \pm 0.26
5	0.86	0.76	0.97	0.73	0.87	0.89	0.62	0.75	0.72	0.80 \pm 0.11
6	0.31	0.26	0.20	0.31	0.35	0.42	0.16	0.22	0.35	0.29 \pm 0.08
7	0.17	0.18	0.16	0.19	0.27	0.22	0.12	0.18	0.25	0.19 \pm 0.05
8	0.14	0.16	0.19	0.13	0.14	0.15	0.18	0.16	0.18	0.16 \pm 0.02
9	0.13	0.12	0.16	0.10	0.12	0.23	0.13	0.16	0.16	0.15 \pm 0.04
10	0.18	0.28	0.45	0.17	0.14	0.16	0.11	0.26	0.18	0.21 \pm 0.10
11	0.41	0.41	0.62	0.73	0.64	0.52	0.49	0.49	0.59	0.54 \pm 0.11
12	0.42	0.14	0.12	0.40	0.11	0.57	0.39	0.14	0.13	0.27 \pm 0.18
13	-----	-----	-----	0.14	0.12	0.17	0.11	0.13	0.12	0.13 \pm 0.02
14	-----	-----	-----	0.11	0.11	0.21	0.11	-----	-----	0.14 \pm 0.05
15	-----	-----	-----	0.09	0.09	0.14	0.10	-----	-----	0.11 \pm 0.02

Dominio relativo: 0.31 \pm 0.21

Tabla XIX. Intensidad relativa de cada uno de los individuos presentes en NoA.

No de referencia. de individuo	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	IRp \pm desv. est.
1	0.20	0.29	0.30	0.34	0.38	0.34	0.37	0.23	0.42	0.32 \pm 0.07
2	0.22	0.32	0.33	0.35	0.41	0.41	0.40	0.24	0.40	0.34 \pm 0.07
3	0.30	0.39	0.41	0.44	0.44	0.53	0.47	0.27	0.55	0.42 \pm 0.12
4	0.32	0.36	0.36	0.45	0.47	0.53	0.62	0.28	0.60	0.44 \pm 0.12
5	0.40	0.41	0.41	0.52	0.55	0.64	0.62	0.27	0.74	0.51 \pm 0.15
6	0.45	0.56	0.62	0.80	0.70	0.70	0.89	0.27	0.93	0.66 \pm 0.21
7	0.53	0.63	0.69	0.68	0.83	0.81	0.90	0.52	0.83	0.71 \pm 0.14
8	0.60	0.40	0.49	0.61	0.59	0.83	0.88	0.22	0.89	0.61 \pm 0.23
9	0.25	0.33	0.37	0.38	0.51	0.44	0.59	0.23	0.85	0.44 \pm 0.19
10	0.28	0.37	0.30	0.38	0.38	0.38	0.45	0.19	0.42	0.35 \pm 0.08

No de referencia. de individuo	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	IRp \pm desv. est.
11	0.30	0.47	0.47	0.47	0.53	0.58	0.65	0.18	0.77	0.49 \pm 0.18
12	0.24	0.33	0.46	0.53	0.53	0.58	0.58	0.16	0.49	0.43 \pm 0.15
13	0.24	0.59	0.60	0.72	0.76	0.77	0.83	0.20	0.82	0.61 \pm 0.24
14	-----	0.61	0.57	0.60	0.59	0.60	0.64	0.16	0.37	0.52 \pm 0.17
15	0.34	0.36	0.47	0.40	0.53	0.29	0.46	0.10	0.32	0.36 \pm 0.13
16	0.22	0.32	0.35	0.34	0.37	0.40	0.61	0.17	0.28	0.34 \pm 0.12
17	0.21	0.31	0.28	0.20	0.20	0.20	0.32	0.15	0.25	0.24 \pm 0.05
18	0.24	-----	0.32	0.20	0.29	0.38	0.51	0.10	0.34	0.30 \pm 0.12
19	0.21	-----	0.27	0.29	0.30	0.29	0.29	0.17	0.35	0.27 \pm 0.06
20	0.22	0.41	0.35	0.32	0.32	0.39	0.29	0.17	-----	0.31 \pm 0.08
21	0.22	0.44	0.37	0.32	0.32	0.32	0.29	0.18	-----	0.31 \pm 0.08

Dominio relativo: 0.43 \pm 0.14

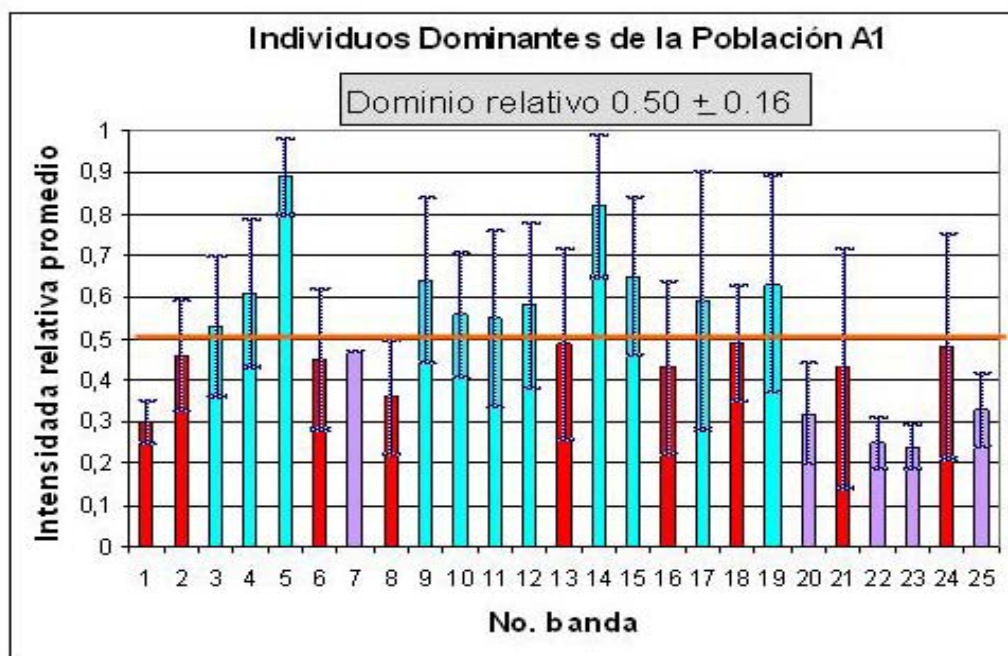


Figura 27. Individuos dominantes de la población A1.

El código de colores corresponde al descrito en la pág. 70 y Tabla XXI.

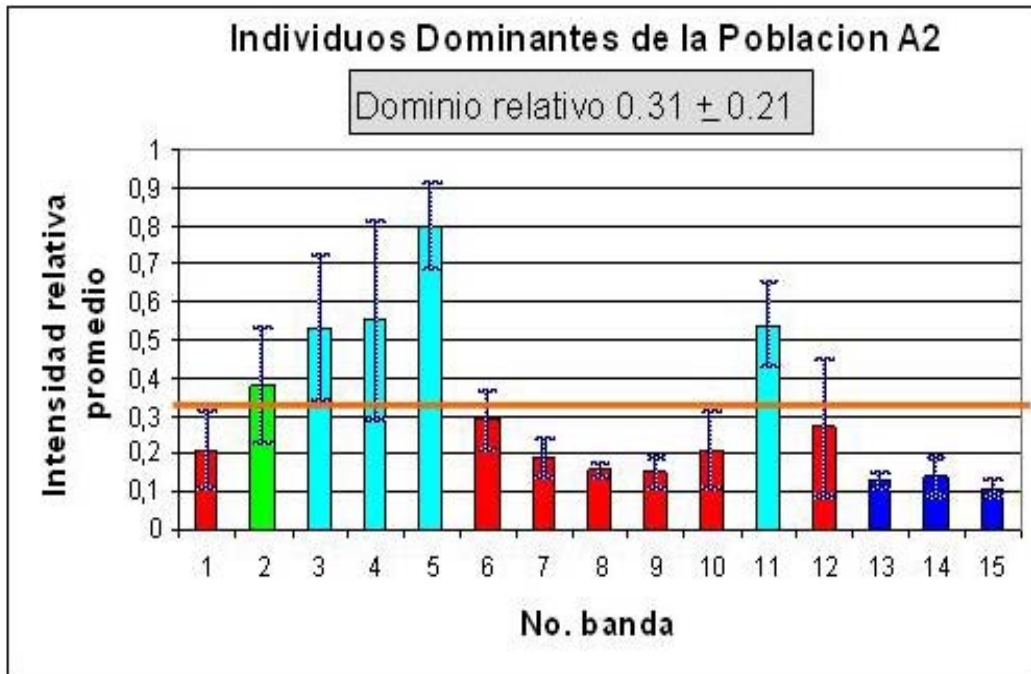


Figura 28. Individuos dominantes de la población A2.
El código de colores corresponde al descrito en la pág. 70 y Tabla XXI.

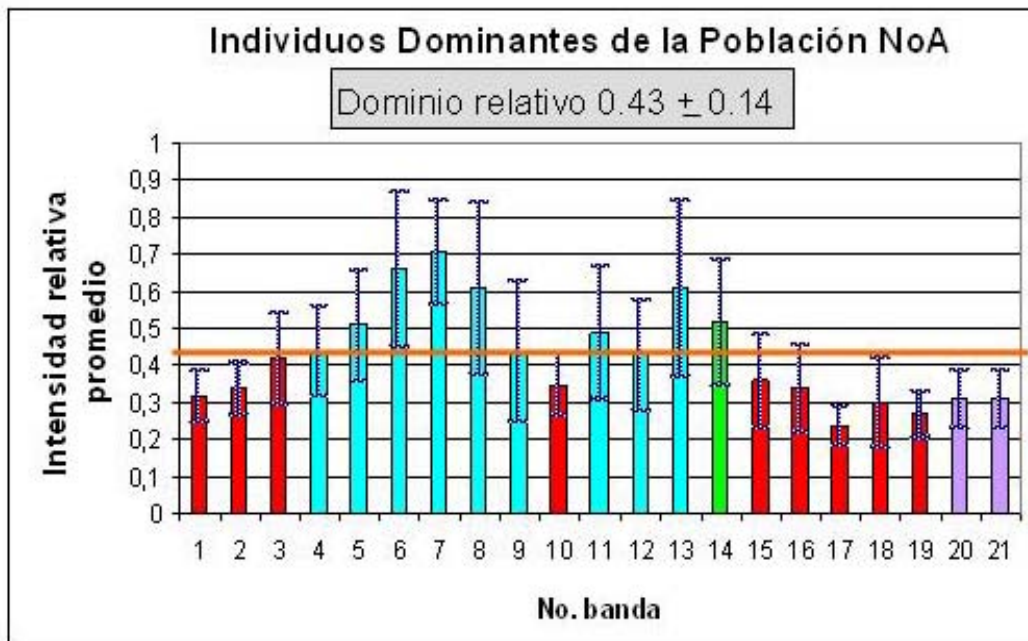


Figura 29. Individuos dominantes de la población NoA.
El código de colores corresponde al descrito en la pág. 70 y Tabla XXI.

Los individuos dominantes (Tabla XX) representan el 48, 44 y 33% de la población en NoA, A1 y A2, respectivamente.

Muestra	No. Bandas	Población (%)	No. de referencia de Individuo (banda)
A1	14	44	3-5, 9-12, 14, 15, 17 y 19.
A2	5	33	2-5 y 11
NoA	10	48	4-9 y 11-14

Esta clasificación no limita el potencial de los individuos que no son dominantes en la comunidad bacteriana en la contribución del desarrollo de las propiedades organolépticas del Cotija durante la maduración, tales como la generación de compuestos de sabor: alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, lactonas, furanos, compuestos fenólicos, pirazinas y ácidos grasos de cadena corta; los que se pueden producir mediante el catabolismo de la lactosa, lípidos y proteínas (Marilley & Casey, 2003). Ya que en algunos casos más que la cantidad de microorganismos o individuos (UFC/mL) es la actividad enzimática la que pondera el grado de contribución.

Por ejemplo, los géneros *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus*, *Brachybacterium*, *Proteus* y *Psychrobacter*, comunes pero raramente mencionados como parte de la microbiota colonizadora en la superficie de quesos madurados, y algunos de ellos considerados como indeseables, por ser en su mayoría patógenos, poseen la capacidad de producir ésteres, cetonas, alcoholes y aldehídos entre otros compuestos de sabor en concentración suficiente, partes por billón (ppb), para producir saborizantes para quesos (Deetae *et al.*, 2007).

Descripción integral de la población bacteriana en el queso Cotija.

En general los individuos de las poblaciones bacterianas de los tres microambientes analizados A1, A2 y NoA se pueden agrupar en cinco categorías (Tabla XXI), las cuales para su fácil identificación se les asignó un color en la imagen digital de la huella génica (Figuras 24, 25 y 26) y en las tablas de individuos dominantes (Figuras 27, 28 y 29):

Categoría I y Categoría II (color cian y rojo): Integra a los individuos capaces de crecer en concentraciones elevadas de sal (4-7.4%) y a_w bajo (0.9-0.86) durante la maduración, lo que los diferencia es su presencia dominante o no dominante, respectivamente, estas categorías están presentes en las tres muestras.

Categoría III y Categoría IV (color verde y azul): Integra a los individuos que a pesar de que su concentración inicial no era suficiente para su detección en el inicio de la maduración, las condiciones posteriores permitieron su desarrollo, aunque no en el mismo grado, lo que las diferenció en dominantes y no dominantes, respectivamente. Por su comportamiento podrían ser considerados como microbiota secundaria. La categoría III está ausente en A1, mientras que la categoría IV únicamente está presente en A2.

Categoría V (color morado): Integra a los individuos que no sobrevivieron a los altos contenidos de sal y a_w bajo.

En resumen (Tabla XXII), la comunidad bacteriana de A1 se compone mayoritariamente de individuos que pertenecen a la categoría I, el resto se divide en las categorías II y V, por lo que carece de individuos categorizados en III y IV. En cuanto a la comunidad bacteriana de A2 el porcentaje mayoritario se integra en la categoría II el resto pertenece a las categorías I, IV y III ordenadas en porcentaje descendente, por lo que carece de individuos categoría V. Y en NoA la mayoría de su población se divide por igual en las categorías I y II, mientras que el resto se agrupa en las categorías V y III, carece de individuos categoría IV.

Categoría	Diversidad, Dinámica y Dominancia			Muestra	No. Bandas	Población (%)	No. de referencia de Individuo (banda)
	SA	C	D				
I (Cian)	SA	C	D	A1	14	44	3-5, 9-12, 14, 15, 17 y 19
				A2	4	26.6	3-5 y 11
				NoA	9	43	4-9 y 11-13
II (Rojo)	SA	C	ND	A1	9	36	1, 2, 6, 8,13,16,18, 21 y 24
				A2	7	46.6	1, 6-10 y 12
				NoA	9	43	1-3, 10 y 15-19
III (Verde)	F	V	D	A1	0	0	-----
				A2	1	6.6	2
				NoA	1	5	14
IV (Azul)	F	V	ND	A1	0	0	-----
				A2	3	20	13-15
				NoA	0	0	-----
V (Morado)	I	V	ND	A1	5	20	7, 20, 22, 23 y 25
				A2	0	0	-----
				NoA	2	9	20 y 21

Abreviaturas: SA, sin alterar; I, inhibición; F, favorecidos; C, constantes; V, variable; ND, no dominante; D, dominante.

Categorías	A1	A2	NoA
	Población (%)		
I	44	26.6	43
II	36	46.6	43
III	0	6.6	5
IV	0	20	0
V	20	0	9

OBJETIVO 2: ¿Es posible diferenciar al auténtico queso Cotija por su población bacteriana?

Para responder esta pregunta se compararon los patrones de bandas de las muestras A1, A2 y NoA, correspondientes al t3 de maduración y la muestra chiapas tiempo único de maduración (Figura 30), mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA) y la construcción del dendrograma, donde ambos métodos agrupan muestras similares.

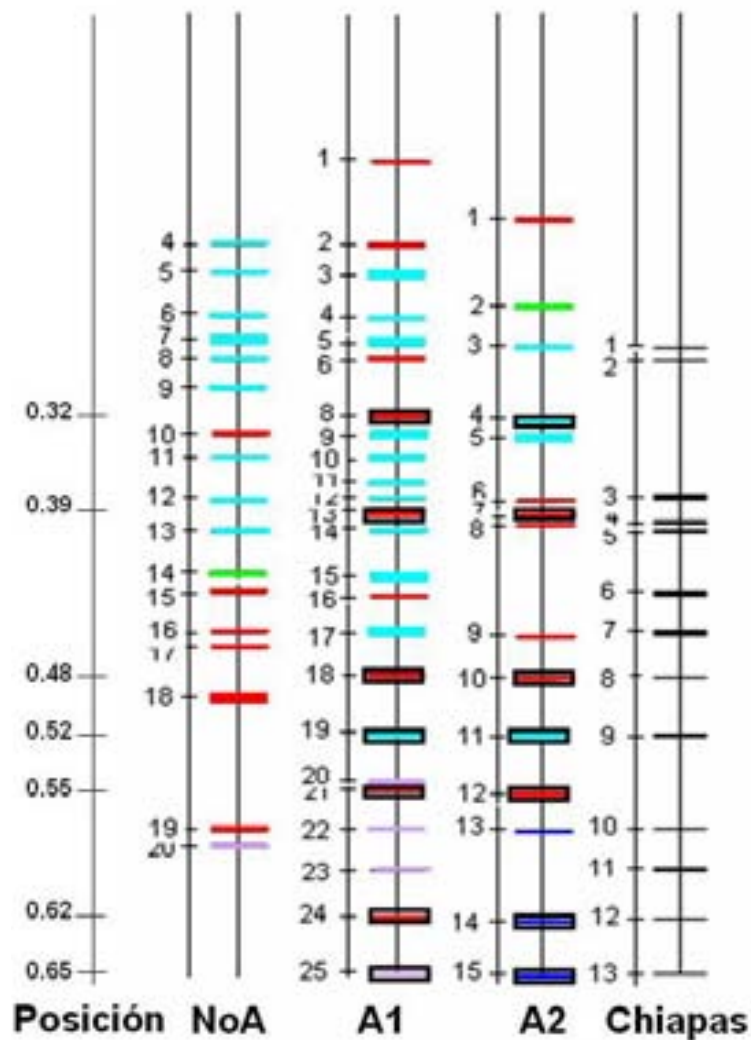


Figura 30. Determinación de las bacterias distintivas.

En el PCA el patrón de bandas de cada columna en del DGGE se codifica en un formato binario, donde la presencia o ausencia de una banda es representada por uno o cero, respectivamente, de esta manera los paquetes complejos de datos pueden ser representados en un gráfico simple que permite observar la dispersión de los datos (Baleiras-Couto *et al.*, 1995), así la cercanía de los puntos revela la similitud entre los patrones de bandas comparados.

En los dendrogramas la similitud entre los patrones de bandas se calcula con base en la distancia de migración (Rf) usando el coeficiente Dice. En este análisis, los dendrogramas fueron construidos usando el UPGMA por sus siglas en ingles Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages, que es uno de los métodos de agrupamiento más empleados (Riley, 2004), donde los patrones de mayor similitud son agrupados en conjuntos cada vez más cercanos. Tanto el dendrograma como el PCA fueron obtenidos usando el software Diversity DateBase (BIORAD).

En el PCA (Figura 31) se observa que las muestras no se relacionan entre sí, inclusive entre las muestras auténticas. El dendrograma (Figura 32) también coloca a cada muestra en conjuntos independientes.

Partiendo de la premisa de que los atributos sensoriales dependen de la microbiota colonizadora, la falta de relación observada entre los patrones de bandas de las muestras auténticas y no auténticas, fundamenta la diferenciación sensorial reportada por Utrera, (2007).

Por otro lado, el que las muestras A1 y A2 que comparten atributos sensoriales distinguibles, muestren patrones de bandas diferentes, sugiere que la presencia de algunos de estos individuos, representados por una banda, es dispensable en la comunidad colonizadora de las mismas. Por lo que se recomienda continuar con los esfuerzos de identificar a los miembros clave de la microbiota colonizadora que intervienen en el desarrollo de los atributos sensoriales consenso o esperados para el auténtico queso Cotija, aquellos que propicien el desarrollo de éstos y los que contribuyen en la inocuidad del producto, con el fin de proponer un inóculo. También es necesario trabajar en la estandarización del proceso de elaboración y materias primas para asegurar que el inóculo se desarrolle en un microambiente similar.

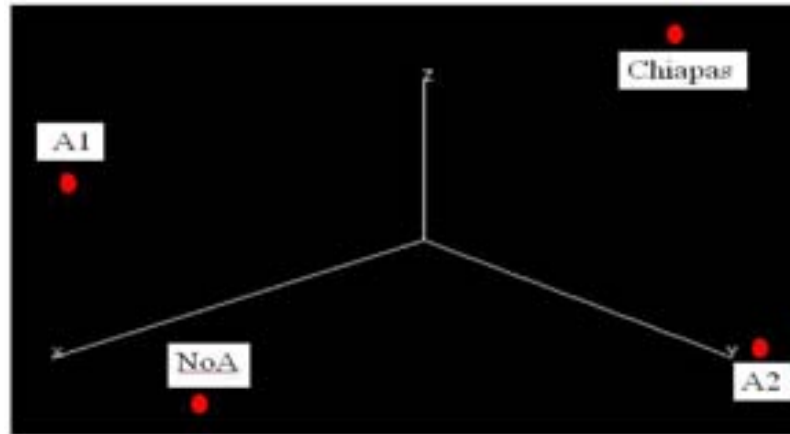


Figura 31. Diagrama PCA que ejemplifica el patrón de poblaciones en las muestras de queso analizadas.

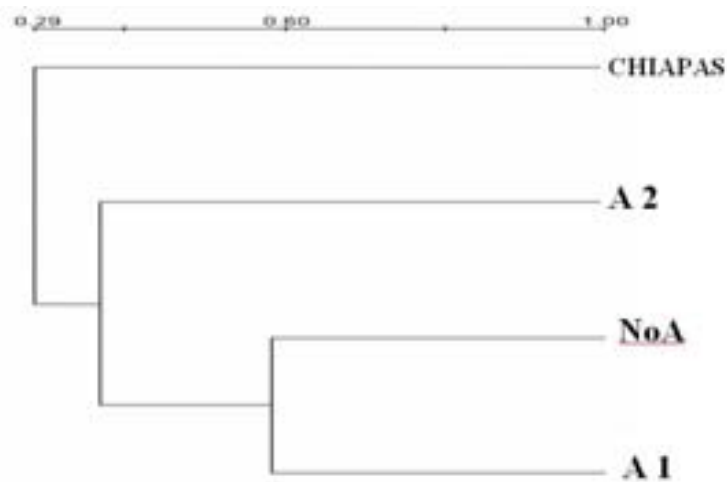


Figura 32. Dendrograma que representa el patrón de poblaciones en las muestras de queso analizadas.

Concretamente respondiendo a la interrogante, la diferenciación por su población bacteriana de los auténticos quesos Cotija por el momento no es factible, pero queda la posibilidad de diferenciación a nivel de individuos.

Posibilidad de diferenciación por individuo:

Las 25 bandas presentes en la muestra A1, las 15 presentes en A2 y las 21 presentes en NoA, fueron comparadas entre sí, con el fin de encontrar las bandas que distingan a los auténticos Cotija, es decir, que estén presentes en A1 y A2, pero no en NoA. En la comparación se encontraron siete bandas, distinguidas con un recuadro en la Figura 30, que denominamos como bacterias distintivas (no se consideró el patrón de bandas de la muestra chiapas, en el criterio de selección de las bacterias distintivas).

Las muestras analizadas son insuficientes para definir a estas siete bandas como un criterio de selección de los auténticos quesos Cotija, pero es un primer acercamiento, se recomienda ampliar el número de muestras para confirmar el resultado. El trabajo se orientó a la identificación de las bandas comunes para las muestras analizadas.

OBJETIVO 3: Clasificación dentro de un género de las bacterias distintivas del auténtico queso Cotija.

Mediante la comparación con patrones de migración.

En una primera aproximación para clasificar a las bacterias distintivas del auténtico Cotija dentro de un género, se trabajó con 24 aislados provenientes de las muestras A1 y A2. Para los cuales se evaluó la pureza mediante cultivo en placa, la morfología macro y microscópica, tinción de Gram y la prueba de la catalasa. Con lo cual se determinó que los aislados tienen características de bacterias lácticas (Tabla XXIII).

Tabla XXIII. Resultados que confirman la pureza de las BAL's aisladas de A1 y A2.				
Clave	Aislado	Morfología		Prueba de la catalasa
		macroscópica	microscópica	
KA ₁ 1	KAA _{A1} 1	Colonias verde metálico con halo oscuro	Cocos Gram (+)	Negativa
KA ₁ 2	KAA _{A1} 2			
KA ₁ 3	KAA _{A1} 3			
KA ₁ 4	KAA _{A1} 4			
KA ₁ 5	KAA _{A1} 5			
KA ₁ 6	KAA _{A1} 6			
KA ₁ 7	KAA _{A1} 7			
KA ₁ 8	KAA _{A1} 8			
KA ₁ 9	KAA _{A1} 9			
KA ₁ 10	KAA _{A1} 10			
L22A ₁ 1	LM17 22°C _{A1} 1	Colonias blancas redondas con superficie lisa brillante.	Cocos Gram (+)	Negativa
L22A ₁ 4	LM17 22°C _{A1} 4			
L37A ₁ 1	LM17 37°C _{A1} 1			
L37A ₁ 3	LM17 37°C _{A1} 3			
L37A ₁ 5	LM17 37°C _{A1} 5			
L37A ₁ 9	LM17 37°C _{A1} 9			
L37A ₁ 10	LM17 37°C _{A1} 10			
MA ₁ 8	MRS+V _{A1} 8	Colonias blancas	Cocos Gram (+)	Negativa
KA ₂ 2	KAA _{A2} 2	Colonias verde metálico con halo oscuro	Cocos Gram (+)	Negativa
KA ₂ 3	KAA _{A2} 3			
KA ₂ 4	KAA _{A2} 4			
KA ₂ 5	KAA _{A2} 5			
KA ₂ 6	KAA _{A2} 6			
KA ₂ 9	KAA _{A2} 9			

En cuanto a la calidad del material genético extraído de las cepas puras en la Figura 31 se observan bandas intensas definidas. En el espectro de absorción (Figura 32) de una de las muestras, se observa una línea definida sin ruido, con un máximo a 260nm (longitud de absorción de los ácidos nucleicos).

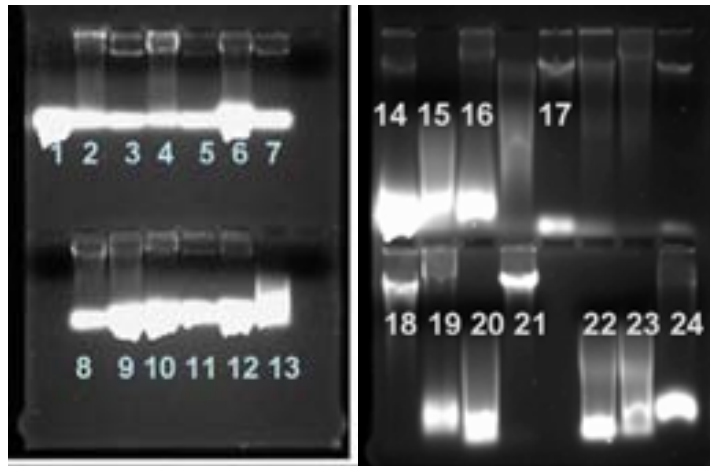


Figura 31. ADN Total de los aislados KA₁ (1-10), L37A₁ (11-15), L22A₁ (16 y 17), MA₁ (18) y KA₂ (19-24). Gel de agarosa al 1.5%(p/v) con 1 µg/mL de BrEt, Vol. carga: 5 µL.

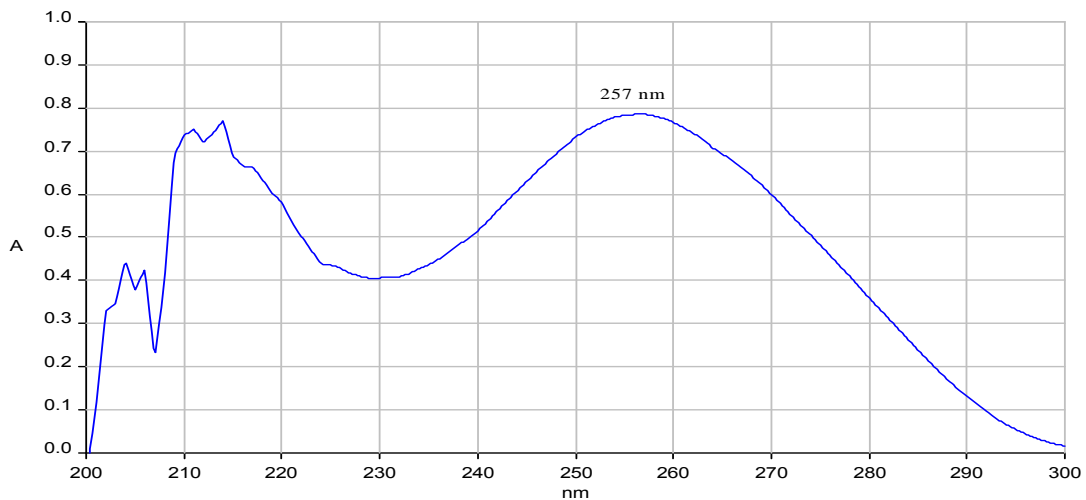


Figura 32. Espectro de absorción para L37A₁ 10 en un barrido de 300 – 200 nm.

En cuanto a los productos de PCR (Figura 33), se verificó que el tamaño fuese de 253pb.

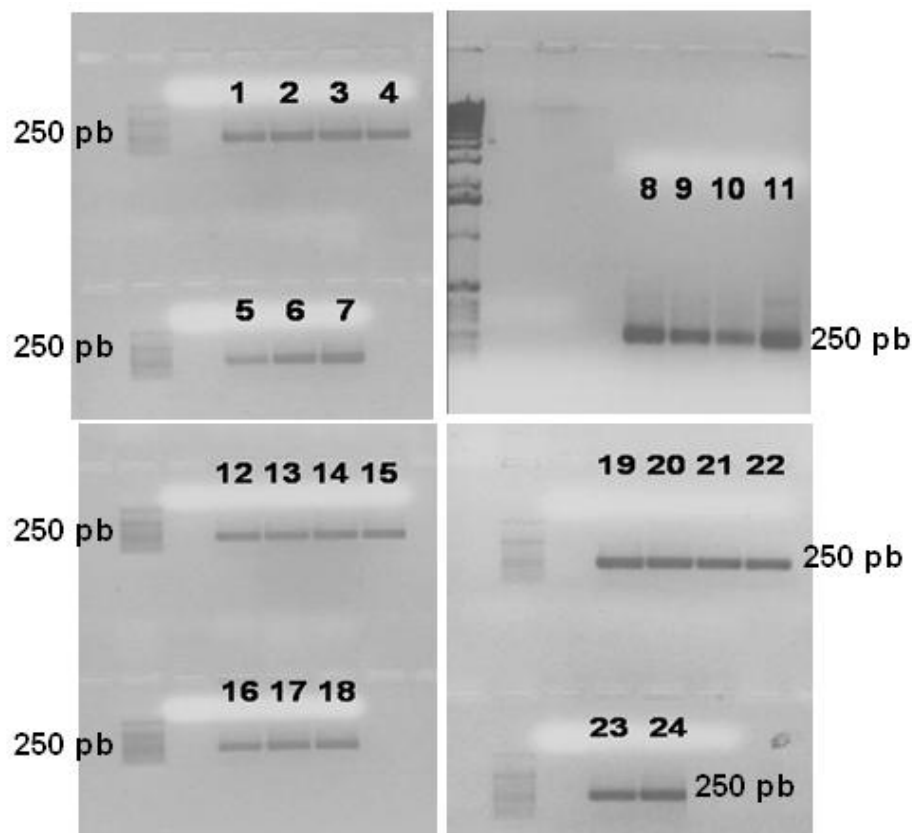


Figura 33. Productos de PCR de los aislados KA₁ (1-10), L37A₁ (11-15), L22A₁ (16 y 17), MA₁ (18) y KA₂ (19-24). Gel de agarosa al 2% (p/v) con 1µg/mL de BrEt, Vol. carga: 8 µL de una reacción de 200ng molde. Marcador O' Range Ruler 50pb DNA Ladder.

Para el caso de los 24 aislados se obtuvo por carril un patrón de bandas en el gel con gradiente desnaturalizante 30-70% (Figuras 34 y 35). Esto se ha atribuido a la microheterogeneidad, primeramente descrita por Dahllorf y colaboradores, (2000), como la representación de un microorganismo por más de una banda, debido a la presencia de múltiples copias del gen 16S ARNr con heterogeneidad intragenómica. Lo que dificulta la identificación mediante la secuenciación del amplicón separado por DGGE, debido a que aumenta la probabilidad de co-migración.

Por ello en años recientes se han propuesto para evitar dicho fenómeno, el uso del gene *rpoB*, que codifica para la subunidad-β de la ARN polimerasa, como gene de identidad y marcador evolutivo, debido a que se encuentra como única copia por bacteria.

Además al igual que el gene ADNr 16S es una molécula funcionalmente constante, se encuentra universalmente en todos los procariotes, presenta regiones conservadas y variables para el diseño de sondas y cebadores que permiten la diferenciación específica, es poco susceptible a la transferencia génica lateral y su tamaño es suficiente para dar información filogenético (Case *et al.*, 2007). Sin embargo, la base de datos es escasa lo que limita la identificación de las secuencias por comparación.

Entre otras posibilidades, se ha reportado que el gen *gyrB*, que codifica para la subunidad- β de la ADN girasa, una ADN topoisomerasa tipo II, puede ser un apropiado marcador filogenético en la sistemática bacteriana (Yamamoto & Harayama, 1998, 1996, 1995; Huang, 1996; Venkateswaran *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2000, 1999; Kasai *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2001; Stackebrandt *et al.*, 2002), por ser esencial y ubicuo en todos los microorganismos (Huang W, 1996) y por contener una alta substitución de bases nucleotídicas (Huang W, 1994; Kelly & Wood, 2000; Watanabe *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2000; Yanez *et al.*, 2003). En el trabajo realizado por Yin y colaboradores, (2008) en el que estudiaron la diversidad bacteriana de una mina empleando los genes marcadores *gyrB* y *16S rRNA* encontraron que los índices de diversidad empleando el gene *gyrB* son mayores en comparación con los resultados obtenidos utilizando el gene ADNr 16S, por lo que proponen al gene *gyrB* como una herramienta de potencial aplicación en el estudio de la diversidad y composición de comunidades microbianas, especialmente, por su mayor resolución, en la diferenciación entre cepas bacterianas de la misma especie. Sin embargo la base de datos para las secuencias del gene *gyrB* es mucho menos completa en comparación con la base de datos de las secuencias del gene *16S rRNA* en términos de cobertura de especies bacterianas y aislados, lo que hace inevitable que algunas secuencias no sean relacionadas con un microorganismo. Otra posibilidad es el gene *rpoD*, que codifica para el factor σ^{70} , uno de los factores σ que confiere la iniciación de la transcripción promotor-específica de la RNA polimerasa (Lonetto *et al.*, 1992). Esta proteína es ubicua en las bacterias y esenciales para el crecimiento celular. Se ha empleado como marcador molecular obteniendo mayor resolución en comparación con las secuencias del 16S rRNA (Yamamoto & Harayama, 1998).

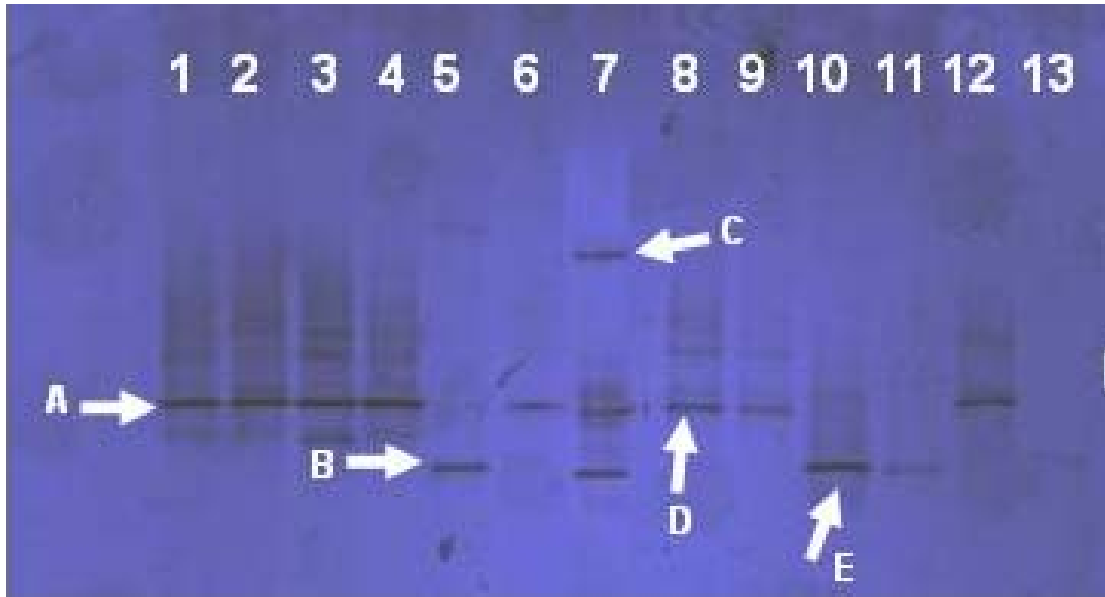


Figura 34. Migración en el DGGE-paralelo de los amplicones de la región V3 del gene ADN_r 16S de los aislados KA₂ 2, 3, 4, 5, 6 y 9 (carril 1-6), MA₁ 8 (carril 7), L22A₁ 1 y 4 (carril 8 y 9) y L37A₁ 3, 5, 9 y 10 (carril 10-13). Gel de poliacrilamida al 8% con gradiente desnaturalizante 30%-70%. Teñido con plata. En todos los carriles se adicionaron 300 ng de ADN.

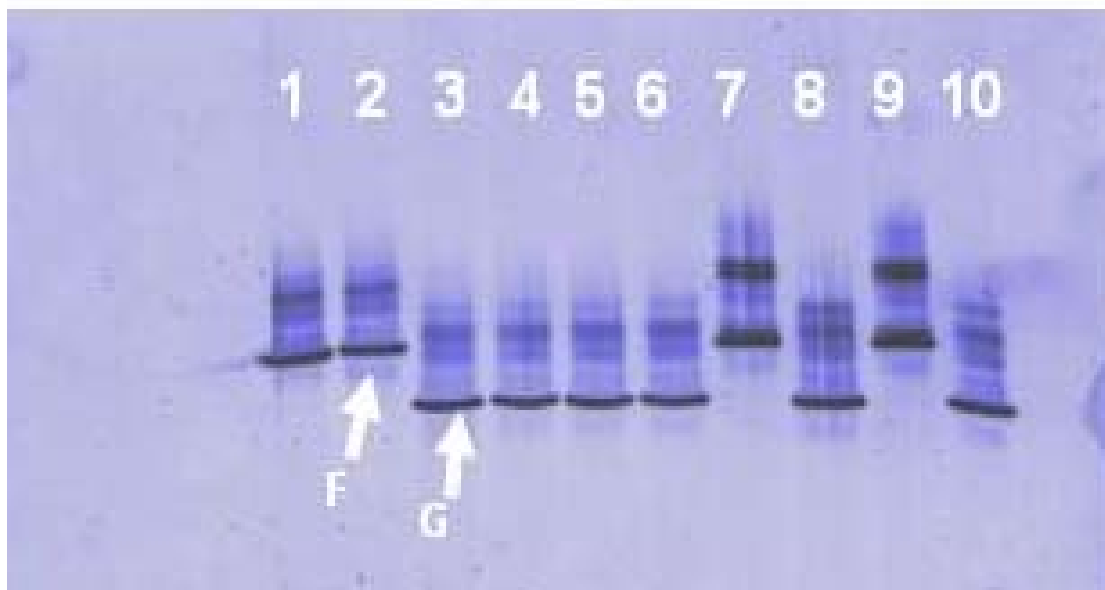


Figura 35. Migración en el DGGE-paralelo de los amplicones de la región V3 del gene ADN_r 16S de los aislados KA₁ 1 a 10 de derecha a izquierda. Gel de poliacrilamida al 8% con gradiente desnaturalizante 30%-70%. Teñido con plata. En todos los carriles adicionaron 300 ng de ADN.

Los aislados fueron agrupados en cuanto a su posición en el DGGE-paralelo, muestra de origen y medio selectivo en el que fueron aislados. Para asignar la posición de cada aislado se eligió una banda representativa que corresponde a la banda más intensa dentro de su patrón de bandas (señalada con una flecha, Figuras 34 y 35).

Así se tienen los siguientes grupos (Tabla XXIV).

Tabla XXIV. Agrupación de los 24 aislados.				
Muestra	Grupo	Medio	Aislado	Posición en el gel
A2	A	KAA	KA ₂ 2, KA ₂ 3, KA ₂ 4, KA ₂ 5 y KA ₂ 9	0.46
	B		KA ₂ 6	0.55
A1	C	MRS+V	MA ₁ 8	0.29
	D	LM17 ^{22°C}	L22A ₁ 1 y L22A ₁ 4	0.46
		LM17 ^{37°C}	L37A ₁ 9	
	E	LM17 ^{37°C}	L37A ₁ 3, L37A ₁ 5 y L37A ₁ 10	0.55
	F	KAA	KA ₁ 2, KA ₁ 4, KA ₁ 9 y KA ₁ 10	0.39
	G		KA ₁ 1, KA ₁ 3, KA ₁ 5, KA ₁ 6, KA ₁ 7 y KA ₁ 8	0.48

Para la muestra A2 los 6 aislados crecidos en medio KAA, tuvieron una posición de 0.46 para cinco de ellos y 0.55 para uno de ellos. Para la muestra A1 el aislado crecidos en medio MRS+V, tuvo una posición de 0.29, los dos aislados crecidos en medio LM17 incubados a 22°C, tuvieron una posición de 0.46, mientras que cuatro de los aislados crecidos en el mismo medio pero incubados a 37°C tuvieron una posición de 0.46 para uno de ellos y 0.55 para tres de ellos. Por último los 10 aislados crecidos en medio KAA, tuvieron una posición de 0.39 para cuatro de ellos y 0.48 para seis de ellos.

Para la clasificación dentro de un género de los miembros de cada grupo, se recuperó el amplicón contenido en la banda representativa de los aislados KA₂ 2, KA₂ 6, MA₁ 8, L22A₁ 1, L37A₁ 3, KA₁ 9 y KA₁ 8 (señaladas con una flecha, Figuras 34 y 35), se prosiguió con la reamplificación, secuenciación (Figura 36), y comparación con la base de datos.



Figura 36. Imagen del amplicón reamplificado para el miembro de cada grupo, a partir de la que se estimó la concentración necesaria para la secuenciación.

Para considerar que los microorganismos pertenecen al mismo género, se requiere como mínimo un 97% de similitud entre las secuencias comparadas (Gevers *et al.*, 2005).

Los resultados de la comparación de las secuencia de la región V3 del gene ADNr 16S de los 7 Grupos (ANEXO III), se encuentran dentro de este límite (Tabla XXV), a excepción del Grupo E.

Tabla XXV. Cuadro integrativo de la clasificación y posición de los patrones de migración.

Grupo	Posición	Aislados	Microorganismo	Porcentaje de Identidad	E value	Tamaño
A	0.46	KA ₂ 2, KA ₂ 3, KA ₂ 4, KA ₂ 5 y KA ₂ 9	<i>E. faecium</i> UC824	99	8e-86	182 pb
B	0.55	KA ₂ 6	<i>E. faecalis</i> N1-33	100	6e-87	180 pb
C	0.29	MA ₁ 8	<i>E. faecalis</i> N1-33	97	2e-81	184 pb
D	0.46	L22A ₁ 1, L22A ₁ 4 y L37A ₁ 9	<i>E. faecium</i> UC824	99	8e-86	182 pb
E	0.55	L37A ₁ 3, L37A ₁ 5 y L37A ₁ 10.	<i>E. faecalis</i> N1-33	87	2e-30	123pb
F	0.39	KA ₁ 2, KA ₁ 4, KA ₁ 9 y KA ₁ 10	<i>E. faecium</i> UC824	100	8e-86	182 pb
G	0.48	KA ₁ 1, KA ₁ 3, KA ₁ 5, KA ₁ 6, KA ₁ 7 y KA ₁ 8	<i>E. faecalis</i> N1-33	100	2e-30	183 pb

Nota: El sombreado corresponde a las bacterias distintivas.

En cuanto a los medios de cultivo empleados, el medio KAA mostro ser selectivo para el género *Enterococcus*, eficiencia reportada por Randazzo y colaboradores, 2002; Fox y colaboradores, 2000, mientras que el medio MRS+V, LM17 a 22 y 37°C de incubación, selectivo para *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *S. thermophilus*, respectivamente, en este trabajo no mostrarón su eficiencia contrario a lo reportado por Randazzo y colaboradores, 2002; Fox y colaboradores, 2000.

Los patrones de migración (Tabla XXV) permitieron identificar a 3 de los individuos distintivos, posicionados en 0.39, 0.48 y 0.55. Estos individuos clasificados a nivel de género como *E. faecalis* N1-33 (0.48 y 0.55) y *E. faecium* UC824 (0.39), se relacionan en un 92%, lo que representa una diferencia de 42pb de entre 524pb. Este porcentaje fue observado al comparar mediante un alineamiento múltiple las secuencias parciales del gene ADNr 16S de las especies *E. faecalis* N1-33 (No. Acceso AB292313) y *E. faecium* UC824 (No. Acceso AJ968595), tomadas del GenBank (Figura 37).

```

E_faecalis_N1-33 -----AGTCGAACGCTTCT
E_faecium_UC824 TGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCT 73 pb
                    *****
E_faecalis_N1-33 TTCCTCCCGAGTGCTTGCACCTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
E_faecium_UC824 TTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT 133 pb
**  * * * * *      *      *****
E_faecalis_N1-33 GGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGCATAACA
E_faecium_UC824 GGGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACA 193 pb
*****
E_faecalis_N1-33 GTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGGCGCTTTCCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCC
E_faecium_UC824 ATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGGCGCTTTCCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCC 253 pb
* * * * *      *      *****
E_faecalis_N1-33 GCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACC
E_faecium_UC824 GCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACC 313 pb
*****
E_faecalis_N1-33 TGAGAGGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
E_faecium_UC824 TGAGAGGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAACCTCCTACGGGAGGCAGC 373 pb
*****
E_faecalis_N1-33 AGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCCGTGAAGAA
E_faecium_UC824 AGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCCGTGAAGAA 433 pb
*****
E_faecalis_N1-33 GGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACCTGAACGT
E_faecium_UC824 GGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCAT 493 pb
***** *
E_faecalis_N1-33 CCCCTGACGGTATCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATA 553 pb
E_faecium_UC824 CCCTTGACGGTATCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTAC-TGCC-----
*** *****
    
```

Figura 37. Alineamiento múltiple de las secuencias del gene ADNr 16S correspondientes a *E. faecalis* N1-33 (No. Acceso AB292313) y *E. faecium* UC824 (No. Acceso AJ968595), mediante el CLUSTAL W versión 1.83 (Thompson *et al.*, 1994). La ausencia de * indica la presencia de bases diferentes en la misma posición. La posición de las secuencias se asigno empleando los cebadores 27F y 1492R para *E. coli* K12.

Dentro del gene ADNr 16S, entre las posiciones 433 y 497, de acuerdo a Brosius *et al.*, 1978, se ubica la región hipervariable V3. De las 64 b que contiene, 7 b son las que permiten distinguir a las especies *E. faecalis* N1-33 (No. Acceso AB292313) y *E. faecium* UC824 (No. Acceso AJ968595). Estas 7 diferencia se encuentran en las 152 b de las secuencias obtenida en este estudio a partir de la banda 0.39, 0.48 y 0.55, lo que permitio distinguir entre especies del mismo género (Figura 38).

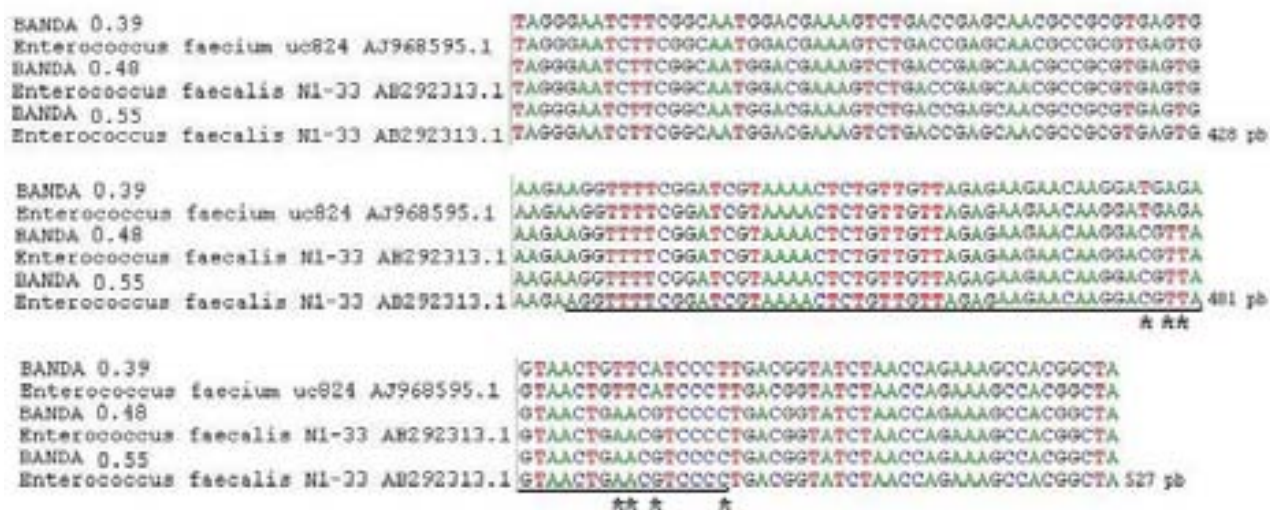


Figura 38. Alineamiento múltiple de la región V3 del gene ADNr 16S correspondientes a *E. faecalis* N1-33 (No. Acceso AB292313), *E. faecium* UC824 (No. Acceso AJ968595), banda 0.39, banda 0.48 y banda 0.55 mediante el CLUSTAL W versión 1.83 (Thompson *et al.*, 1994). El símbolo * indica la presencia de bases diferentes en la misma posición. El fragmento subrayado de las secuencias corresponde a la sección hipervariable de la región V3 (Brosius *et al.*, 1978). La posición de las secuencias se asigno empleando los cebadores 27F y 1492R para *E. coli* K12.

El género *Enterococcus* ha sido reconocido por su papel benéfico en las fermentaciones de alimentos de origen cárnico, lácteo y vegetal (Giraffa, 2002; Hugas *et al.*, 2003), siendo las especies *E. faecium* y *E. faecalis* las predominantes en los quesos madurados como el Manchego (Ordoñez *et al.*, 1978), Mozzarella (Coppola *et al.*, 1988) y Emmental (Teuber *et al.*, 1996), entre otros, por lo que no es de extrañarse su presencia en el Cotija. Puntualmente la cepa *E. faecalis* N1-33 a sido reconocida por la producción de enterocinas tipo N con potencial aplicación como bioconservador (Hata *et al.*, 2007, sin publicar), característica que en el queso Cotija resulta ser de gran utilidad, debido al uso de leche bronca y ausencia de tratamiento térmico durante su elaboración.

Con este antecedente en el grupo de trabajo Santiago, (2007), evaluó el potencial bactericida o bacteriostático de 4 de los aislados empleados como patrón de migración, en la fase logarítmica tardía y en la fase estacionaria temprana de crecimiento, mediante la prueba en microplaca y difusión en agar, utilizando como microorganismo indicador a *Micrococcus lysodeiktitikus* y *S. aureus*, respectivamente. Para la prueba en microplaca la actividad se definió como la disminución en 0.001 de la D.O. a 595nm por minuto, como resultado de la lisis celular del microorganismo indicador (Lee & Yang, 2002). La producción de enterocinas de los aislados se reporta como mg de proteína en el sobrenadante.

Los resultados (Tabla XXVI) indican que los aislados KA₂ 6 y KA₁ 8 clasificados como *E. faecalis* N1-33 y los aislados KA₂ 2 y KA₁ 9 clasificados como *E. faecium* UC824 muestran actividad bacteriostática ante *S. aureus* y *Micrococcus lysodeiktitikus*.

Tabla XXVI. Potencial bacteriostático de los aislados empelados como patrón de migración.

Aislado	Presunta identidad	Prueba presuntiva vs <i>S. aureus</i> en placa (mm halo de inhibición/mg proteína)		Actividad especifica vs <i>Micrococcus lysodeiktitikus</i> en microplaca (U/min*mg proteína)	
		Fase logarítmica	Fase estacionaria	Fase logarítmica	Fase estacionaria
KA ₂ 6	<i>E. faecalis</i> N1-33	33.33	18.31	4.54	2.28
KA ₂ 2	<i>E. faecium</i> UC824	Nd	42.86	51.49	5.81
KA ₁ 9	<i>E. faecium</i> UC824	Nd	Nd	Nd	6.15
KA ₁ 8	<i>E. faecalis</i> N1-33	Nd	Nd	Nd	5.93

Nd no detectado.

Secuenciación del producto de PCR separado por DGGE.

Para la identificación de las 4 restantes bacterias distintivas posicionadas en 0.32, 0.52, 0.62 y 0.65, se procedio a cortar la banda directamente del gel, se recuperó el amplicón, se reamplificó y secuenció tal y como se describió en el apartado 6 de la sección MATERIALES Y MÉTODOS.

En 3 de las 4 secuencias resultantes se observaron regiones extensas donde las bases nucleotídicas eran indeterminadas debido a la presencia de dos o más amplicones que se interferían al secuenciar, hecho atribuido a la co-migración, lo que hizo imposible

su clasificación. Por lo que esta estrategia sólo permitió identificar a la bacteria distintiva posicionada en 0.52, cuya secuencia de 198 b fue clara (ANEXO III).

La comparación de la secuencia con la base de datos mostró cinco resultados (Tabla XXVII), para el género *Marinilactibacillus* que difieren en cuanto a especie y cepa, para los cuales el porcentaje de identidad varía entre 97 y 96%.

No. Acceso	Bacteria	Cepa	% Identidad	E value
DQ344838	<i>Marinilactibacillus sp.</i>	89.1 mbsf	97	5e-78
AB247277	<i>M. piezotolerans</i>	JCM12337	97	5e-78
AY485792	<i>M. piezotolerans</i>	LT20	97	5e-78
DQ361015	<i>M. psychrotolerans</i>	1MD	96	2e-76
AB083406	<i>M. psychrotolerans</i>	M13-2	96	2e-76

Las especies *Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2 y de *Marinilactibacillus piezotolerans* LT20, se relacionan en un 99.5%, lo que representa una diferencia de 7 b de entre 1332 b. Este porcentaje fue observado al comparar mediante un alineamiento múltiple las secuencias completas del gene ADNr 16S de las especies *Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2 (No. Acceso AY485792) y de *Marinilactibacillus piezotolerans* LT20 (No. Acceso AB083406), tomadas del GenBank (Figura 39). Esta cercana relación ya había sido observada por Toffin y colaboradores, 2005, al reportar un 99% de similitud entre estas dos especies.

```

M_psychrotolerans AACGGATGCTAATACCGCATATCTCTTCGAGACGCCTGTCTCTTAGATGAAAGGTGGCTT
M_piezotolerans -----AAAGGTGGCTT 229 pb
*****

M_psychrotolerans CGGCTGCCGCTTATGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGTAATGGCTCAC
M_piezotolerans CGGCTGCCGCTTATGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGTAATGGCTCAC 289 pb
*****

M_psychrotolerans CAAGGCTGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACC
M_piezotolerans CAAGGCTGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACC 349 pb
*****

M_psychrotolerans GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGTGAAAACCTGATG
M_piezotolerans GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGTGAAAACCTGATG 409 pb
*****

M_psychrotolerans GAGCAATACCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGA
M_piezotolerans GAGCAATACCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGA 469 pb
*****

M_psychrotolerans ATAAGTCGGGTAGTAAC T GCCCGGCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGTCACGGCTAAC
M_piezotolerans ACAAGTCGGGTAGTAAC T GCCCGGCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGTCACGGYTAAC 529 pb
*****

M_psychrotolerans TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGACAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT
M_piezotolerans TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGACAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT 589 pb
*****

M_psychrotolerans AAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGG
M_piezotolerans AAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGG 649 pb
*****

M_psychrotolerans GTCATTGGAACTGGAAGACTTGAATGCAGAAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGG
M_piezotolerans GTCATTGGAACTGGAAGACTTGAATGCAGAAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGG 709 pb
*****

M_psychrotolerans TGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAATT
M_piezotolerans TGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAATT 769 pb
*****

M_psychrotolerans GACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
M_piezotolerans GACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC 829 pb
*****

M_psychrotolerans GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGGAGCTAACGCAT
M_piezotolerans GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGGAG- TAACGCAT 889 pb
*****

M_psychrotolerans TAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGAC
M_piezotolerans TAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGAC 949 pb
*****

M_psychrotolerans CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
M_piezotolerans CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC 1,009 pb
*****

M_psychrotolerans TTGACATCCTCTGAACACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTG
M_piezotolerans TTGACATCCTCTGAACACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTG 1,069 pb
*****

M_psychrotolerans GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCA
M_piezotolerans GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCA 1,129 pb
*****

M_psychrotolerans ACCCCTATTGTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGATAAA
M_piezotolerans ACCCCTATTGTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGATAAA 1,189 pb
*****

M_psychrotolerans CCGGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAG
M_piezotolerans CCGGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAG 1,249 pb
*****

```

```

M_psychrotolerans TGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCCTAAAGC
M_piezotolerans   TGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCCTAAAGC 1,309 pb
*****
M_psychrotolerans CATTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAAT
M_piezotolerans   CATTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAAT 1,369 pb
*****
M_psychrotolerans CGCGGATCAGAACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACAC
M_piezotolerans   CGCGGATCAGAACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACAC 1,429 pb
*****
M_psychrotolerans CACGAGAGTCTGTAACACCCGAAGTCGGTAGGGTAACCCCTTTTGGGAGCCAGCCGCCGAA
M_piezotolerans   CACGAGAGTCTGTAACACCCGAAGTCGGTAGGGTAACCCCTTTTGGGAGCCAGCCGCCGAA 1,489 pb
*****
M_psychrotolerans GGTGGGATGGATGATTGG-----
M_piezotolerans   GGTGGGATGGATGATTGGGTTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTG 1,549 pb
*****
M_psychrotolerans ----
M_piezotolerans   GATC

```

Figura 39. Alineamiento múltiple de las secuencias del gene ADNr 16S que corresponden a *Marinilactibacillus piezotolerans* LT20 (No. Acceso AY485792) y *Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2 (No. Acceso AB083406), construido mediante el CLUSTAL W versión 1.83 (Thompson *et al.*, 1994). Las posiciones enmarcadas en un recuadro indica la presencia de bases diferentes en la misma posición. La posición de las secuencias se asigno empleando los cebadores 27F y 1492R para *E. coli* K12.

Dentro del gene ADNr 16S, entre las posiciones 433 y 497, de acuerdo a Brosius *et al.*, 1978, se ubica la región hipervariable V3. De las 64 b que contiene, 1 b es la que permiten distinguir a las especies *Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2 (No. Acceso AY485792) y *Marinilactibacillus piezotolerans* LT20 (No. Acceso AB083406). La secuencia de 152 b obtenida en este estudio a partir de la banda 0.52, contiene esta única diferencia ubicada en la posición 471, lo que la haría más semejante a la especie *psychrotolerans* (Figura 40). Sin embargo, esta diferencia no se considera suficiente para clasificar a la banda 0.52 a nivel de especie.



Figura 40. Alineamiento múltiple de la región V3 del gene ADNr 16S correspondientes a la banda 0.52, *Marinilactibacillus piezotolerans* LT20 (No. Acceso AY485792) y *Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2 (No. Acceso AB083406), construido mediante el CLUSTAL W versión 1.83 (Thompson *et al.*, 1994). El símbolo * indica la presencia de bases diferentes en la misma posición. El fragmento subrayado de las secuencias corresponde a la sección hipervariable de la región V3 (Brosius *et al.*, 1978). La posición de las secuencias se asigno empleando los cebadores 27F y 1492R para *E. coli* K12.

La presencia del género *Marinilactibacillus* en productos fermentados de origen lacteo como lo es el el queso Cotija, ya habia sido previamente reportado. Especificamente la especie *M. psychrotolerans* cepa M13-2, fue la primera de este género en ser aislada de un queso rojo madurado untable de origen alemán, encontrándose en una concentración de entre $10^6 - 10^7$ UFC por g de queso (Maoz *et al.*, 2003). La cepa O21, de esta misma especie, también fue aislada de un tipo de queso similar untable de origen francés en niveles de 8×10^8 UFC/mL, que representa el 15% de la población total, ambos quesos contienen entre 1.5 - 3% de sal de mar (Feurer *et al.*, 2004). Otra cepa la 1MD fue aislada en una concentración de $10^5 - 10^{10}$ UFC por g de queso de la superficie de quesos madurados untables de origen frances como el Munster, Maroilles, Epoisses, Livarot, Langres (Monnet *et al.*, 2006). Las cepas M13-2 y O21 fueron descritas primeramente por Ishikawa y colaboradores, (2003) junto con otras cinco cepas en organismos marinos.

En la Tabla XXVIII se muestran algunas de las características fenotípicas de las especies *M. piezotolerans* y *M. psychrotolerans* (Toffin *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2003), de donde resalta su capacidad de usar la lactosa y su carácter halotolerante e inclusive halófilico lo que les permite colonizar en ambientes con alto contenido de sal, como lo es el queso Cotija.

Si se quisiera identificar en el queso Cotija la presencia del género *Marinilactibacillus* a nivel de especie, se sugiere la búsqueda de genes distintivos que sólo estén presentes en una de las especies, por ejemplo: un fragmento de la secuencia codificante de la β -galactosidasa que distinguiría a *Marinilactibacillus piezotolerans*. O la secuenciación de una región mayor o de otra región hipervariable del gene ADNr 16S.

Tabla XXVIII. Características fenotípicas de las especies y cepas de <i>Marinilactibacillus</i>.		
Características fenotípicas	<i>M. piezotolerans</i> LT20	<i>M. psychrotolerans</i> M13-2
Act. Catalasa	Positiva	Negativa
Act. Oxidasa	Negativa	Negativa
Act. β -galactosidasa	Positiva	Negativa
Tinción Gram	Positiva	Positiva
Prod. esporas	Negativa	Negativa
CHO's Fermentables	Lactosa, glucosa, galactosa	Lactosa, glucosa, galactosa
Movilidad	Negativa	Positiva, flagelos peritricos
Respiración	Anaerobia facultativa	Anaerobia facultativa
% NaCl óptimo (p/v)	1 – 2	2 – 3.75
rango % NaCl (p/v)	0 – 12	0 - 20.5
pH óptimo	7 – 8	8 - 9.5
rango pH	7 – 9	6 - 10
T óptima (°C)	37 – 40	37- 40
rango T (°C)	4 – 50	-1.8 a 45
P. hidrostática (MPa)	0.1 óptima; tolera 30	Sin estudio
% molar G+C	42	36.2

(Toffin *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2003).

Secuenciación del inserto separado por clonación.

La clonación se utilizó como un método alternativo de separación, para resolver el problema de la co-migración, que se presentó en las bacterias distintivas 0.32, 0.62 y 0.65. Los amplicones fueron reamplificados en las condiciones descritas para favorecer la adenilación del extremo 3'.

Los resultados muestran (Figura 41) dos bandas definidas de aprox. 200pb que corresponden a las bacterias distintivas 0.32 y 0.62. No se logró la reamplificación de la bacteria distintiva 0.65.

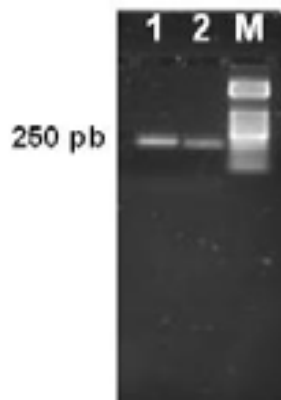


Figura 41. Amplicones reamplificados de las bacterias distintivas 0.32 (1) y 0.64 (2). Marcador O' Range Ruler 50pb DNA Ladder (M), de izq. a der. Gel de agarosa al 2%(p/v) con 1mg/mL de BrEt, Vol. carga: 8 μ L de una reacción de 200ng molde.

Se prosiguió con la construcción del plásmido (vector + amplicón) y posteriormente la transformación. Se obtuvieron 0 colonias para el control negativo, 175 colonias para la bacteria distintiva 0.32 y 120 para la bacteria distintiva 0.62. Se subcultivaron 10 colonias de cada transformación.

Después de aislar los plásmidos, se eligió al azar uno de cada bacteria distintiva y se llevó a cabo la digestión (Figura 42) la cual permitió linearizar la construcción y el vector para confirmar el tamaño esperado de 4,150pb (3956pb Vector + 200pb amplicón sin grapa GC) y 3,956pb, repectivamente.

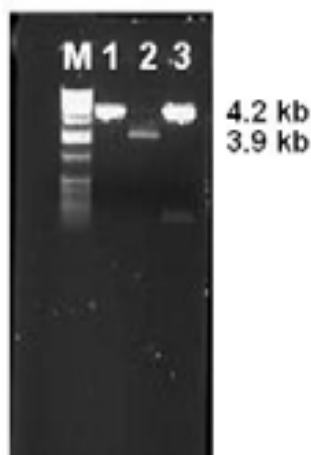


Figura 42. Se muestra de izquierda a derecha; la digestión de la construcción que contiene a la banda 0.32 (1), vector pCR4-TOPO (2), la construcción que contiene a la banda 0.62 (3) y el marcador 1kb DNA Ladder, INVITROGEN (M). Gel de agarosa al 1%(p/v) con 1mg/mL de BrEt, Vol. carga: 3 μ L.

Las construcciones de interés se enviaron a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular, UNAM, con el cebador T3.

Las secuencias resultantes (ANEXO III) al ser comparadas con las bases de datos mostraron los siguientes resultados: para la banda 0.32 se presentaron 7 opciones (Tabla XXIX), para el género *Vagococcus* que difieren en cuanto a especie y cepa, para los cuales el porcentaje de identidad varía entre 100 y 98%.

Tabla XXIX. Resultados de la comparación en el BLAST para la banda 0.32.					
No. Acceso	Bacteria	Cepa /Clona	% Identidad	E value	Ambiente
AY511744	**Clona	GC113.18	100	5e-98	Heces de vaca.*Petridis <i>et al.</i> , 2003.
AY433935	<i>Vagococcus sp.</i>	cmufm6-2	99	2e-96	Hierbas y alimentos fermentados. *Pruksakorn <i>et al.</i> , 2003.
DQ364595	<i>Vagococcus sp.</i>	9.28	98	1e-94	Cuero de búfalo. *Shede <i>et al.</i> , 2006.
DQ395281	<i>V. lutrae</i>	F01595	98	1e-94	Sedimento marino. *Morey <i>et al.</i> , 2006.
AB211029	<i>Vagococcus sp.</i>	SSCS12	98	1e-94	Composta de sedimento de aguas cloacales. *Ohnishi <i>et al.</i> , 2005.
Y17152	<i>V. lutrae</i>	CCUG39187	98	1e-94	Órganos de nutria. Lawson <i>et al.</i> , 1999
AY179329	<i>V. carniphilus</i>	1843-02T	98	5e-93	Carne molida de res y granja de peces. Shewmaker <i>et al.</i> , 2004; Michel <i>et al.</i> , 2007.

**No cultivable. * Trabajos sin publicar.

Las especies *Vagococcus lutrae* CCUG39187T y *Vagococcus carniphilus* 1843-02T, se relacionan en un 96.7%, lo que representa una diferencia de 48 b de entre 1463 b. Este porcentaje fue observado al comparar mediante un alineamiento múltiple las secuencias completas del gene ADNr 16S de las especies *Vagococcus lutrae* CCUG39187T (No. Acceso Y17152) y *Vagococcus carniphilus* 1843-02T (No. Acceso AY179329), tomadas del GenBank (Figura 43). Esta cercana relación ya había sido observada por Shewmaker y colaboradores, (2004), al reportar un 96% de similitud entre estas dos especies, al comparar 1407 b.

```

V_lutrae      -----TGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCT-ITTTACACGGGTG
V_carniphilus GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTGAITTTACACGGGA-G 85 pb
                *****
V_lutrae      CTTCACCCACCGAGAAA-GAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCC
V_carniphilus CTYGC-TCCACCGAAAATCAAGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCC 145 pb
                ** ** ***** ** * *****
V_lutrae      CATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAAATCTTTTGTCCGC
V_carniphilus CAACAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAAATGTTTTCCGCA 205 pb
                ** ***** **** **
V_lutrae      TGACAGAGAGATAAAAAGACGCTTTCGGGTGCTACTGATGGATGGGCCCGGCTGCATTAG
V_carniphilus TGGAAGAATAATAAAAAGACGCTTC--GGTGTCTACTGTTGGATGGGCCCGGCTGCATTAG 265 pb
                ** *** ***** *****
V_lutrae      CTAGTTGGTGGGGTAANGGCTCACCAAGGCATGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
V_carniphilus TTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGACCATGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT 325 pb
                ***** ** *****
V_lutrae      CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
V_carniphilus CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT 385 pb
                *****
V_lutrae      TCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATC
V_carniphilus TCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATC 445 pb
                *****
V_lutrae      GTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGTGAGAGAGTAACTGTTCTCACCTTGACGGTA
V_carniphilus GTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGTGAGAGAGTAACTGTTCTCACCTTGACGGTA 505 pb
                *****
V_lutrae      TCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGGTAATACGTAGGTGGCAA
V_carniphilus TCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGGTAATACGTAGGTGGCAA 565 pb
                *****
    
```

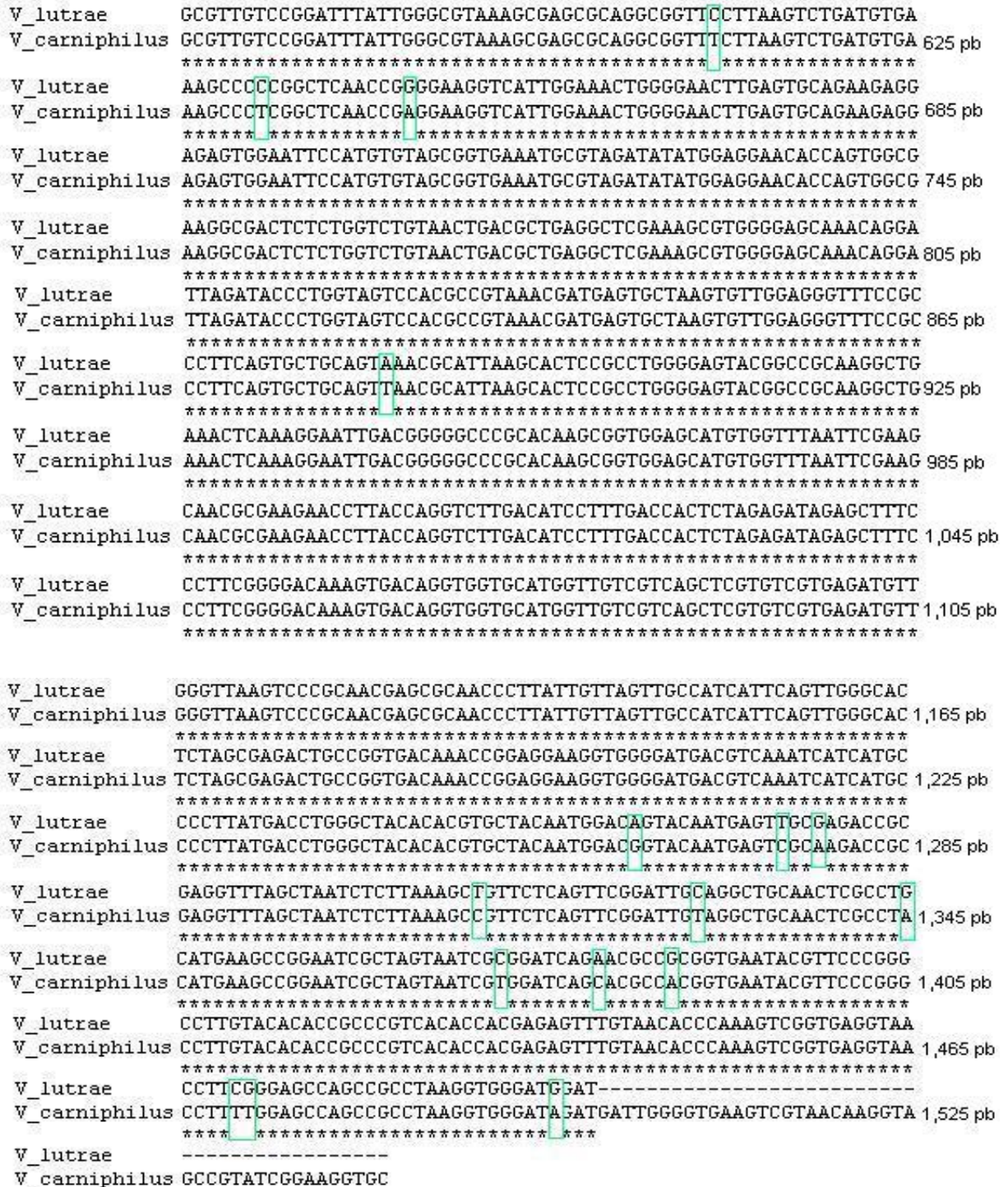


Figura 43. Alineamiento múltiple de las secuencias del gene ADNr 16S que corresponden a *Vagococcus lutrae* CCUG39187T (No. Acceso Y17152) y *Vagococcus carniphilus* 1843-O2T (No. Acceso AY179329), mediante el CLUSTAL W versión 1.83 (Thompson *et al.*, 1994). Las posiciones enmarcadas en un recuadro indica la presencia de bases diferentes en la misma posición. La posición de las secuencias se asigno empleando los cebadores 27F y 1492R para *E. coli* K12.

Dentro del gene ADNr 16S, entre las posiciones 433 y 497, de acuerdo a Brosius *et al.*, 1978, se ubica la región hipervariable V3. De las 64 b que contiene, 1 b es la que permiten distinguir a las especies *Vagococcus lutrae* CCUG39187T (No. Acceso Y17152) y *Vagococcus carniphilus* 1843-02T (No. Acceso AY179329). La secuencia de 152 b obtenida en este estudio a partir de la banda 0.32, contiene esta única diferencia ubicada en la posición 484, lo que la haría más semejante a la especie *lutrae* (Figura 44). Sin embargo, esta diferencia no se considera suficiente para clasificar a la banda 0.32 a nivel de especie.

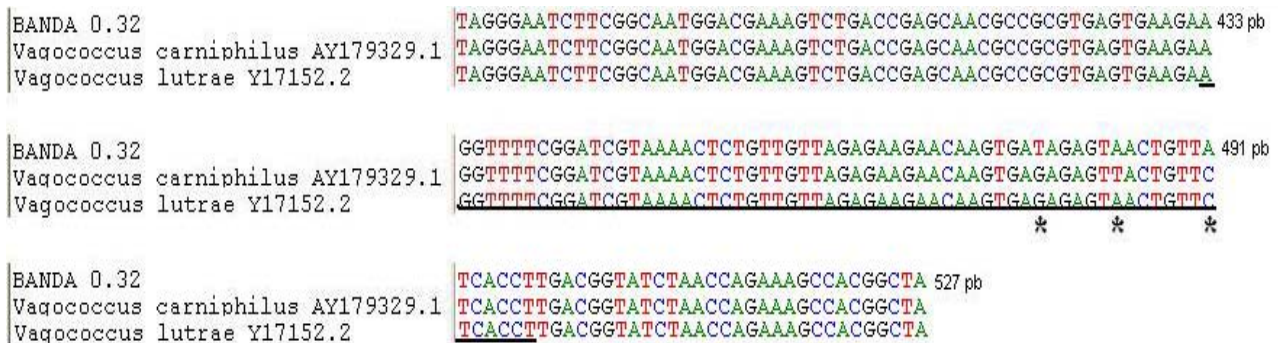


Figura 44. Alineamiento múltiple de la región V3 del gene ADNr 16S correspondientes a la banda 0.32, *Vagococcus lutrae* CCUG39187T (No. Acceso Y17152) y *Vagococcus carniphilus* 1843-02T (No. Acceso AY179329), mediante el CLUSTAL W versión 1.83 (Thompson *et al.*, 1994). El símbolo * indica la presencia de bases diferentes en la misma posición. El fragmento subrayado de las secuencias corresponde a la sección hipervariable de la región V3 (Brosius *et al.*, 1978). La posición de las secuencias se asignó empleando los cebadores 27F y 1492R para *E. coli* K12.

La presencia del género *Vagococcus* en productos fermentados de origen lácteo como lo es el queso Cotija, no ha sido reportada previamente. Algunos de los ambientes donde se ha repostado su presencia y que tienen relación con el queso Cotija son: el ambiente de granja y ambiente marino, este último debido a que durante su elaboración se emplea sal de mar (Tabla XXIX).

En la Tabla XXX se enlistan algunas características fenotípicas de la especie *V. carniphilus* 1843-02T (Shewmaker *et al.*, 2004), de donde resalta su carácter halófilo lo que le permite colonizar en el queso Cotija.

Si se quisiera identificar en el queso Cotija la presencia del género *Vagococcus* a nivel de especie, se sugiere la secuenciación de una región mayor o de otra región hipervariable del gene ADNr 16S.

Tabla XXX. Características fenotípicas de <i>Vagococcus carniphilus</i>	
Características fenotípicas	<i>Vagococcus carniphilus</i> 1843-O2T
Act. Catalasa	Negativa
Act. β-galactosidasa	Negativa
Tinción Gram	Positiva
CHO's Fermentables	D-ribosa
Movilidad	Positiva
Respiración	Anaerobia facultativa
% NaCl (p/v)	6.5
pH	7.6
T óptima (°C)	35
rango T (°C)	10 - 45
% molar G+C	34

(Shewmaker *et al.*, 2004).

La comparación con la base de datos del GenBank, de la secuencia contenida en la banda 0.62, dio como resultado un valor del 100% de identidad y un E valor de 1e-98 para *Enterococcus faecium* IDCC2104 (No. Acceso EU003448). En la Figura se observa la similitud de cada una de las bases 152 b comparadas.

```

BANDA 0.62                                     TAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTG 428 pb
Enterococcus faecium IDCC2104 EU003448.1 TAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTG

BANDA 0.62                                     AAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGA 481 pb
Enterococcus faecium IDCC2104 EU003448.1 AAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGA

BANDA 0.62                                     G--TAACTGTTTCAATCCC-TTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTA 530 pb
Enterococcus faecium IDCC2104 EU003448.1 G--TAACTGTTTCAATCCC-TTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTA
    
```

Figura 45. Alineamiento múltiple de la región V3 del gene ADNr 16S correspondientes a la banda 0.62 y *Enterococcus faecium* IDCC2104 (No. Acceso EU003448), construido mediante el CLUSTAL W versión 1.83 (Thompson *et al.*, 1994). El símbolo * indica la presencia de bases diferentes en la misma posición. El fragmento subrayado de las secuencias corresponde a la sección hipervariable de la región V3 (Brosius *et al.*, 1978). La posición de las secuencias se asigno empleando los cebadores 27F y 1492R para *E. coli* K12.

El *Enterococcus faecium* IDCC2104, ha sido reconocido por su potencial función como probiótico (Kwon *et al.*, 2007, sin publicar). En general a los *Enterococcus* se les reconoce su papel benéfico en las fermentaciones de alimentos de origen cárnico, lácteo y vegetal (Giraffa, 2002; Hugas *et al.*, 2003), por su contribución en las propiedades organolépticas y en la calidad sanitaria del producto por su capacidad de producir enterocinas (Vancanneyt *et al.*, 2002; De Vuyst *et al.*, 2003). Sin embargo, no se debe minimizar su intervención en infecciones oportunistas e intoxicaciones (Franz *et al.*, 1999; Hardie & Whiley, 1997; Kayser, 2003; Lopes *et al.*, 2005).

Prueba de confiabilidad de la clasificación de las bacterias distintivas.

Para conocer el intervalo de confianza de la clasificación asignada a las secuencias contenidas en las bandas 0.32, 0.39, 0.48, 0.52, 0.55 y 0.62, se procedió a realizar el análisis por Bootstrap. Un total de 44 fragmentos de 152 b (posición 376 a 528) fueron analizados, de los cuales 37 corresponden a 13 géneros pertenecientes a la familia de las BAL's (Tabla XXXI), 6 a las secuencias obtenidas en éste estudio y una perteneciente a *E. coli str. k-12 substr. MG1655*. Los fragmentos fueron alineados utilizando el programa Greengenes disponible en línea (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-NAST_align.cgi).

Tabla XXXI. BAL's empleadas en la determinación del intervalo de confianza mediante Bootstrap.		
Microorganismo	No. Acceso GenBank	Estudio
<i>Enterococcus faecium</i> Lz105	EU780144.1	Especies estrechamente relacionadas de <i>Enterococcus</i> , Wang <i>et al.</i> , 2008, sin publicar.
<i>Enterococcus faecium</i> M0138	EU789396.1	Ecología microbiana del koumiss (bebida fermentada de leche de yegua). Chen, 2008, sin publicar.
<i>Enterococcus faecium</i> IDCC2104	EU003448.1	<i>Enterococcus</i> con potencial probióticos. Kwon, sin publicar.
<i>Enterococcus faecium</i> GMRS18	EU420176.1	Productos fermentados de leche de camello. Abdelgadir <i>et al.</i> , 2008.
<i>Enterococcus faecium</i> uc824	AJ968595.1	Bacterias comensales aisladas de sangre de cordón umbilical. Jimenez <i>et al.</i> , sin publicar.
<i>Enterococcus faecalis</i> NR1	EU807757.1	Taxonomía molecular de <i>Enterococcus faecalis</i> . Zhao & Chen, sin publicar.

Microorganismo	No. Acceso GenBank	Estudio
<i>Enterococcus faecalis</i> Zy05	EU717965.1	Especies estrechamente relacionadas de <i>Enterococcus</i> , Wang <i>et al.</i> , 2008, sin publicar.
<i>Enterococcus faecalis</i> N1-33	AB292313.1	Enterococco productor de enterocinas aislado de vegetales fermentados. Hata <i>et al.</i> , sin publicar.
<i>Enterococcus faecalis</i> C193151ed5A	EU285587.1	<i>Enterococcus</i> aislados de pollos. Petersen <i>et al.</i> , 2008.
<i>Enterococcus durans</i> k22-24	EU333895.1	Bacterias cultivables aisladas del desierto frío de los Himalayas. Mayilraj & Saini, sin publicar.
<i>Enterococcus hirae</i> H1	EU887813.1	Bacterias anaeróbicas aisladas del digestor de una planta de biogas. Nayak & Kale, sin publicar.
<i>Enterococcus phoeniculicula</i>	AY028437.2	Nueva especie aislada de glandulas urinarias. Law-Brown & Meyers, 2003.
<i>Enterococcus columbae</i>	X56422.1	Especies aisladas de intestino de pichon. Devriese <i>et al.</i> , 1990.
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	US30931.1	Bacteriófagos. Mold-Lawes, 1994.
<i>Enterococcus gallinarum</i> F02025	DQ465366.1	Identificación de <i>Enterococcus</i> en ambientes marinos. Moore <i>et al.</i> , 2006.
<i>Enterococcus sulfureus</i> A36202	AY184239.1	Caracterización de Bacterias Acido Lácticas (BAL's) en pozol, bebida de maíz fermentado. Diaz-Ruiz <i>et al.</i> , 2003.
<i>Enterococcus italicus</i> NRIC 0105	AB362594.1	Estudio de BAL's. Tanaka <i>et al.</i> , 2007, sin publicar.
<i>Enterococcus saccharominimus</i> LMG22197	AJ626904.1	Nueva especie aislada de productos lácteos. Vancanneyt <i>et al.</i> , 2004.
<i>Vagococcus lutrae</i> CCUG39187	Y17152.2	Nueva especie aislada de órganos de nutria. Lawson <i>et al.</i> , 1999.
<i>Vagococcus carniphilus</i>	AY179329.1	Nueva especie aislada de carne molida de res. Shewmaker <i>et al.</i> , 2004.
<i>Vagococcus fessus</i> m2661/98/1	AJ243326.1	Nueva especie aislada de foca y marsopa. Hoyles <i>et al.</i> , 2000.
<i>Vagococcus</i> sp. JIP 14-01	AM490371.1	BAL's asociadas a peces y granjas de peces. Michel <i>et al.</i> , 2007.
<i>Vagococcus fluvialis</i>	X54258.1	Nueva especie aislada a partir de agua de río. Collins <i>et al.</i> , 1989.

<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 3366-01	AM490365.1	BAL's asociadas a peces y granjas de peces. Michel <i>et al.</i> , 2007.
<i>Streptococcus thermophilus</i> 29-2-2	EU130904.1	Estudios referentes a productos lácteos. Chen <i>et al.</i> , 2007, sin publicar.
<i>Pediococcus pentosaceus</i> BMG 74	EU080993.1	Colección aislada de mariscos y productos cárnicos. Najjari <i>et al.</i> , sin publicar.
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ps2	AJ414691.1	Estudios referentes a productos lácteos. Giraffa <i>et al.</i> , 2003.
<i>Alloiococcus otitis</i> ALK-6	AY179185.1	Bacterias aisladas de ambientes extremos. Ghauri <i>et al.</i> , sin publicar.
<i>Dolosigranilum pigrum</i>	X70907.1	Nueva especie aislada de infecciones humanas. Aguirre <i>et al.</i> , sin publicar.
<i>Alkalibacterium olivoapovliticus</i> WW2-SN4a	AF143511.2	Nueva especie alcalófila obligada aislada de agua de lavado del fruto del olivo. Ntougias & Russell, 2001.
<i>Marinilactibacillus piezotolerans</i>	AY485792.1	Bacterias cultivables aisladas de sedimento marino. Toffin <i>et al.</i> , 2004.
<i>Marinilactibacillus piezotolerans</i> JCM12337T	AB247277.1	Secuenciación del gene 16S ARNr. Yamasato & Ishikawa, 2006.
<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i> M13-2	AB083406.1	Bacterias ácido lácticas marinas aisladas de organismos marinos de templadas y subtropicales áreas. Ishikawa <i>et al.</i> , 2003.
<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i> 1MD	DQ361015.1	Queso madurado untable de origen francés. Monnet <i>et al.</i> , 2006.
<i>Weissella</i> sp. MRS-I09	AF138781.1	BAL's aisladas de masa de maíz fermentada. Pozol Ampe <i>et al.</i> , 1999.
<i>Leuconostoc</i> sp. R-19397	AJ937758.1	BAL's aisladas de productos lácteos de origen rumano. Zamfir <i>et al.</i> , 2006.
<i>Oenococcus oeni</i> 95 St.Mer-8-1	AB054808.1	BAL's aisladas de Vino rojo. Sato <i>et al.</i> , 2001.
<i>Escherichia coli</i> str. <i>k-12</i> substr. MG1655	U00096	

La relación filogenética entre las BAL's representada en la topología del árbol consenso (Figura 46), inferida mediante el método de Neighbor-Joining, agrupa a los 13 distintos géneros por familia, lo que concuerda con lo reportado por Stiles & Holzapfel, 1997. Así tenemos que *Vagococcus* y *Enterococcus* pertenecen a la familia *Enterococcaceae*; *Lactococcus* y *Streptococcus* a la familia *Streptococcaceae*; *Pediococcus* y *Lactobacillus* a la familia *Lactobacillaceae*; *Alloiococcus*, *Alkalibacterium*, *Marinilactibacillus* y *Dolosigranillum* a la familia *Carnobacteriaceae* (Ntougias & Russell, 2001); y *Weissella*, *Leuconostoc* y *Oenococcus* a la familia *Leuconostocaceae*. Ésta última familia presenta una clara separación de las otras familias tal y como fue reportado por Olsen y colaboradores, 1991; De Rijk y colaboradores, 1992. Las cuatro familias pertenecen al orden de los Lactobacillales y al phylum Firmicutes.

Escherichia coli str. *k-12* substr. *MG1655* pertenecer al phylum Proteobacteria, por lo que sirvió de grupo externo para dar mayor robustez al análisis.

La cercana relación y sus características fenotípicas similares entre los géneros *Vagococcus* y *Enterococcus* frecuentemente dificultan su diferenciación por pruebas convencionales bioquímicas (Collins *et al.*, 1989; Shewmaker *et al.*, 2004).

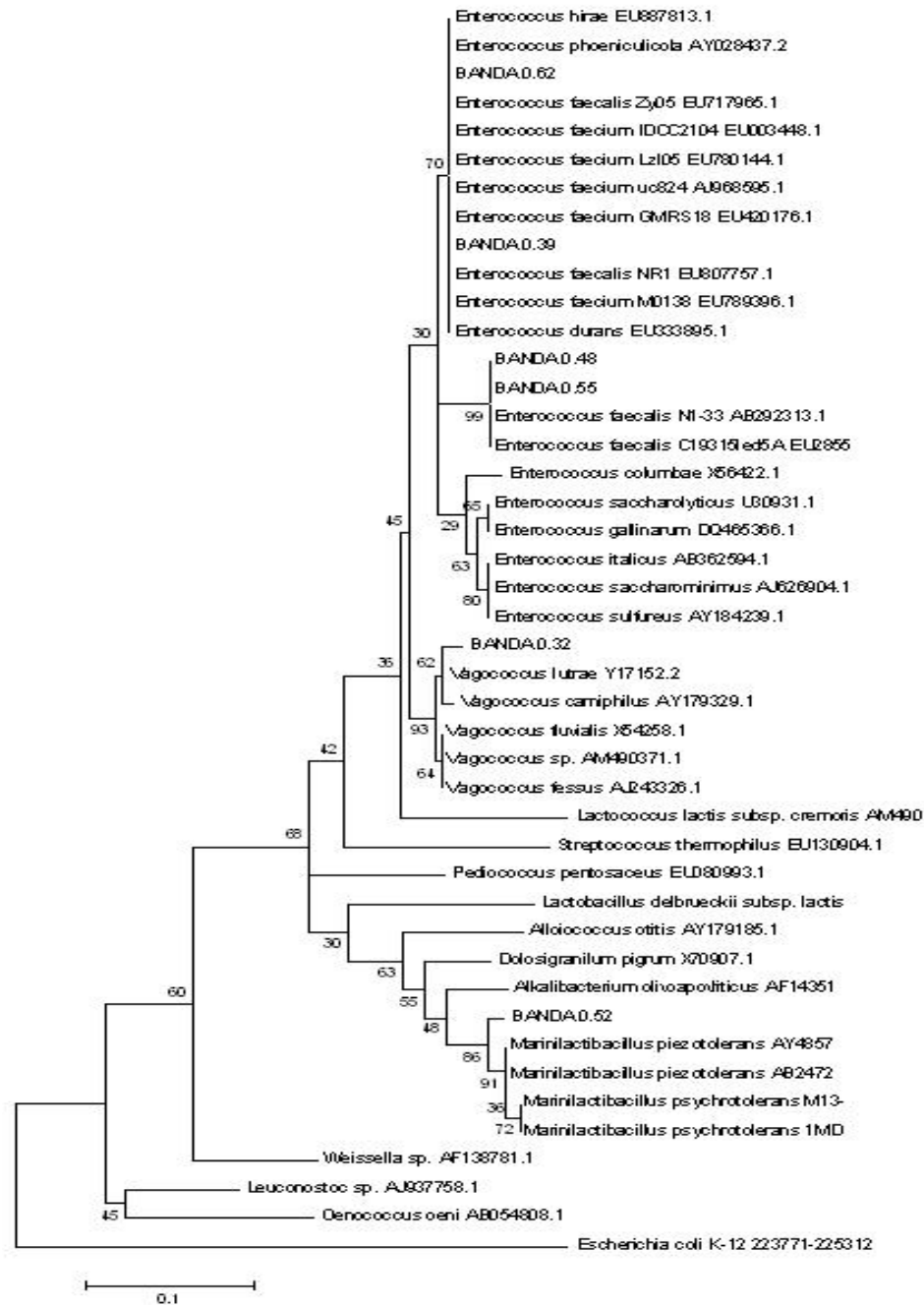


Figura 46. Relación filogenética de las bacterias ácido lácticas, empleando la región V3 del gene ADN_r 16S. La relación filogenética fue inferida usando el método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). El árbol consenso inferido de entre 1000 remuestreos, representa la relación entre las 44 secuencias analizadas (Felsenstein, 1985). El valor que se muestra junto al nodo de donde se derivan las ramas del árbol, corresponde al porcentaje en el que fueron asociadas las secuencias en el mismo clado en el análisis por bootstrap, 1000 remuestreos (Felsenstein, 1985). La distancia de la relación fue calculada usando el método de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993). Todas las posiciones que contenían gaps fueron eliminadas del grupo de secuencias analizadas. Cada una de las secuencias analizadas contenía 152 posiciones. El análisis fue realizado empleando el MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

En cuanto a la prueba de confiabilidad de la clasificación, la banda 0.62 y banda 0.39 tienen un intervalo de confianza del 70% de pertenecer a la especie *Enterococcus faecium*. Mientras que las bandas 0.48 y 0.55 presentaron un intervalo de confianza del 99% de pertenecer a la especie *Enterococcus faecalis*.

Para la banda 0.32 el intervalo de confianza es del 93% de pertenecer al género *Vagococcus*. Mientras que la banda 0.52 presentó un intervalo de confianza del 91% de pertenecer al género *Marinilactibacillus*. Un porcentaje mayor o igual a 70 se considera un valor confiable.

Descripción del comportamiento de las bacterias distintivas.

En la Tabla XXXII se resumen los datos de clasificación de las secuencias correspondientes a las bacterias distintivas analizadas por el BLAST.

TABLA XXXII. Clasificación de las bacterias distintivas.				
Posición	Microorganismo	Método identificación	% Identidad	Intervalo de confianza (%)
0.32	<i>Vagococcus sp.</i> ^a	***	100-98	93
0.39	<i>Enterococcus faecium</i> UC824 ^a	*	100	70
0.48	<i>Enterococcus faecalis</i> N1-33	*	100	99
0.52	<i>Marinilactibacillus sp.</i>	**	97-96	91
0.55	<i>Enterococcus faecalis</i> N1-33 ^a	*	100	99
0.62	<i>Enterococcus faecium</i> IDCC2104	***	100	70
0.65	-----Sin identificar-----	-----	-----	

*Comparación con patrones de migración de cepas aisladas, **Secuenciación del producto de PCR separado por DGGE y ***Secuenciación del inserto separado por clonación. ^a Presentes sólo en queso Cotija.

Según los resultados del análisis global tenemos que (Tabla XXXIII):

Grupo 1) *Enterococcus faecium* UC824 (posición 0.39) y *Enterococcus faecalis* N1-33 (posición 0.48 y 0.55) forman parte de los individuos de la Categoría II, esto es, que estuvieron presentes desde el inicio de la maduración y se mantuvieron durante los 220 días restantes del estudio adaptándose a las condiciones elevadas de sal, a_w bajo y pH ligeramente ácido, aunque en niveles por debajo del valor de dominio relativo. Éste comportamiento fue independiente del microambiente en el que se desarrollaron.

Grupo 2) *Marinilactibacillus sp.* (posición 0.52) forma parte de los individuos de la Categoría I, por lo que se comportó como individuo dominante durante los 7 meses de la maduración independiente del microambiente en el que se desarrolló.

Grupo 3) El comportamiento de *Vagococcus sp.* (posición 0.32) durante los 7 meses de la maduración fue dependiente del microambiente en el que se desarrolló, esto es, dominante en A2 y no dominante en A1.

Grupo 4) La presencia no dominante de *Enterococcus faecium IDCC2104* (posición 0.62) fue independiente del microambiente en el que se desarrolló, mientras que la etapa de detección fue influenciada por el microambiente o por la carga inicial de ésta, así en A1 se detectó desde el inicio hasta el final de la maduración y en A2 a los 73 días de iniciada la maduración.

Grupo 5) El comportamiento de la banda 0.65 es otro ejemplo que sugiere un microambiente más estresante en la muestra A1, ya que su desarrollo fue inhibido a los 99 días de maduración, mientras que en A2 su desarrollo se favoreció y logro ser detectada a los 73 días de iniciada la maduración, su presencia fue no dominante en ambas muestras.

Tabla XXXIII. Comportamiento de las bacterias distintivas.						
Gpo.	Bacteria	Posición	A1 (banda)	Categoría	A2 (banda)	Categoría
3	<i>Vagococcus sp.</i>	0.32	8	II	4	I
1	<i>E. faecium</i> UC824	0.39	13	II	7	II
1	<i>E. faecalis</i> N1-33	0.48	18	II	10	II
2	<i>Marinilactibacillus sp.</i>	0.52	19	I	11	I
1	<i>E. faecalis</i> N1-33	0.55	21	II	12	II
4	<i>E. faecium</i> IDCC2104	0.62	24	II	14	IV
5	----- Sin identificar-----	0.65	25	V	15	IV

*Las categorías corresponden a las descritas en la pág. 70 y Tabla XXI.

IX. CONCLUSIONES.

1) El método de extracción y purificación de ADN directamente del Queso Cotija implementado durante este trabajo, permitió obtenerlo en cantidad y calidad suficiente para la realización de la PCR.

2) En la huella génica de las muestras A1, A2 y NoA, se observó una gran complejidad lo que aunado a la microheterogeneidad y co-migración dificultó el análisis e identificación de cada individuo de la población bacteriana.

3) Los resultados del análisis global de la diversidad, dinámica y dominancia relativa de las poblaciones bacterianas, sugieren que las operaciones posteriores a la obtención de la cuajada contribuyen ampliamente en la cantidad y diversidad de la microbiota colonizadora.

4) Los métodos dependientes de cultivo, permitieron aislar BAL's pertenecientes al género *Enterococcus*.

5) Por métodos independientes de cultivo se identificaron microorganismos pertenecientes al grupo de bacterias lácticas que se han encontrado en otros productos lácteos tradicionales de fermentación espontánea. Tal es el caso de *Enterococcus* y *Marinilactibacillus*.

6) La secuenciación de la región V3 del ADNr 16S permitió identificar especies de *Enterococcus*, y a los géneros *Vagococcus* y *Marinilactibacillus*.

7) Las especies de *Enterococcus* identificadas no fueron población dominante, sin embargo estuvieron presentes y se mantuvieron durante el periodo analizado del proceso de maduración.

8) El género *Marinilactibacillus* fue dominante durante el periodo de maduración estudiado.

9) El género *Vagococcus* estuvo presente en el periodo de maduración estudiado y su domiancia fue dependiente del microambiente en que se desarrolló.

X. RECOMENDACIONES.

Debido a que el método de DGGE no es suficiente para establecer una “huella” de los microorganismos característicos de este producto, por la presencia de los fenómenos de microheterogeneidad y co-migración, así como por la complejidad del sistema, se recomienda hacer búsquedas grupo, género o especie–específicas para la caracterización del producto.

XI. ANEXOS

ANEXO 1. Variantes del método de extracción de ADN directamente del alimento.

En este apartado se describen los protocolos Nubel y colaboradores, (1999) y Stoolminikit QIAGEN (Figura 47).



Figura 47. Esquema general de los tres protocolos de extracción del material genético.

Protocolo Nubel-Ampe *et al*, 1999.

En este procedimiento la variante fue la remoción de contaminantes que se llevó a cabo mediante la extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) para separar el ADN de las proteínas.

- 1) Proceder conforme a los 5 primeros pasos del protocolo QIAGEN-modificado.
- 2) Enfriar a temperatura ambiente y adicionar 300 μ L de NaCl 5M (la adición de SDS y NaCl, es para desestabiliza los agregados proteicos y conferir carga, respectivamente, lo cual hace eficiente la remoción de proteínas durante la extracción con fenol-cloroformo).
- 3) Dividir el volumen en alícuotas de aproximadamente 0.5 mL en tubos eppendorf de 1.5 mL.
- 4) Adicionar 800 μ L de la solución fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1), en la campana.
- 5) Agitar en el vortex vigorosamente por aproximadamente 15 min, de esto depende la remoción de las proteínas.
- 6) Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min. Recuperar la fase acuosa sin tocar la interfase y transferirla a un eppendorf (2 mL) limpio.
- 7) Repetir la extracción (pasos 8-10) hasta que la interfase (proteínas) sea nula.
- 8) Transferir la fase acuosa a un eppendorf (2 mL) limpio.
- 9) Adicionar 2 volúmenes de etanol al 100% (v/v) a -20°C e incubar a la misma temperatura por 1 hr, ya que de esta manera se favorece la precipitación del ADN.
- 10) Centrifugar a 13,000 rpm durante 20 min., lavar el precipitado con 1 mL de etanol al 70% (v/v) dos veces, dejar que el etanol remanente se evapore a Tamb.
- 11) Resuspender el precipitado en 50 μ L de buffer TE.

Protocolo Stool minikit QIAGEN

En este procedimiento la variante fue la lisis celular que se realizó mediante la adición del buffer ASL (cuyos componentes no se especifican en el manual de uso) y la adición de la pastilla inhibitex que elimina los posibles contaminantes presentes en la muestra que inhiban la reacción de PCR.

- 1) Resuspender el pellet celular en 1.4 mL de buffer AL, agitar e Incubar a 70°C por 15 min.
- 2) Adicionar la tableta inhibitex, incubar a temperatura ambiente por 1 min. o hasta que la tableta se disuelva completamente.
- 3) Centrifugar por 3 min a 14,000 rpm

- 4) Transferir 800 μL del sobrenadante a un eppendorf limpio (1.5 mL), adicionar 15 μL de proteinasa K y 200 μL del buffer AL, agitar vigorosamente.
- 5) Incubar a 70°C por 10 min.
- 6) Adicionar 200 μL de etanol al 96% (v/v) a temperatura ambiente, la mezcla se agita y se vierte todo el volumen a la columna-membrana del kit stool QIAGEN.
- 7) Continuar conforme a los últimos 6 pasos del protocolo QIAGEN-modificado.

La **elección del mejor protocolo** se fundamento en los resultados de índice de pureza y concentración de ADN (Tabla XXXIV), que posicionan al procedimiento QIAGEN-modificado como el mejor, por ser con el que se extrajo una mayor cantidad de ADN de calidad suficiente que permitió la amplificación (Figura 47).

Tabla XXXIV. Determinación de la concentración y pureza del ADN total.		
Procedimiento	260nm/280nm (índice de pureza)	μg ADN/mL
Nubel-Ampe	1.169	20.66
QIAGEN-modificado	1.504	28.65
Stool minikit QIAGEN	1.308	10.79



Figura 48. Amplicones usando como templado ADN extraído con el procedimiento Stool minikit QIAGEN; Carril (1), Procedimiento QIAGEN-modificado; Carril (2), Procedimiento Nubel-Ampe; Carril (3), Blanco; Carril (4) y Control positivo; Carril (5).

ANEXO II. Equipo y soluciones empleadas en el DGGE perpendicular y paralelo.

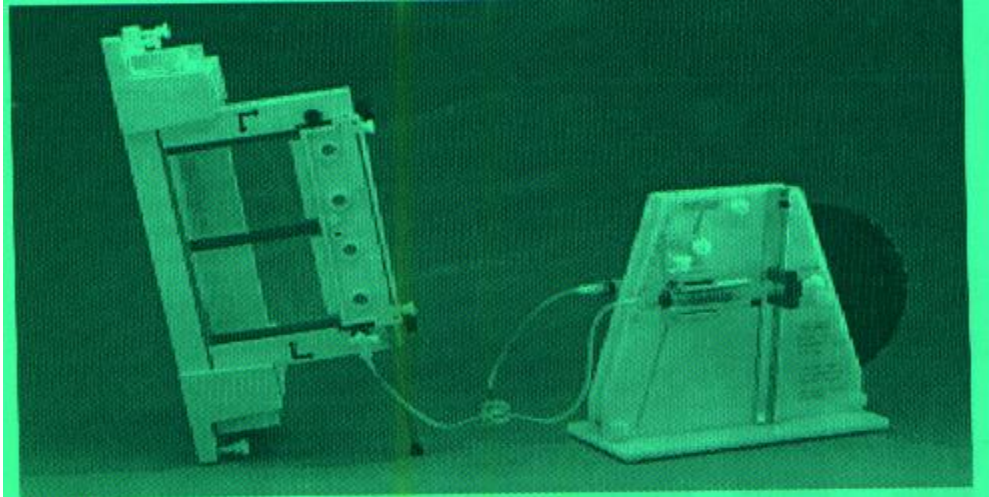


Figura 49. Esquema general del equipo empleado para la técnica de DGGE perpendicular.

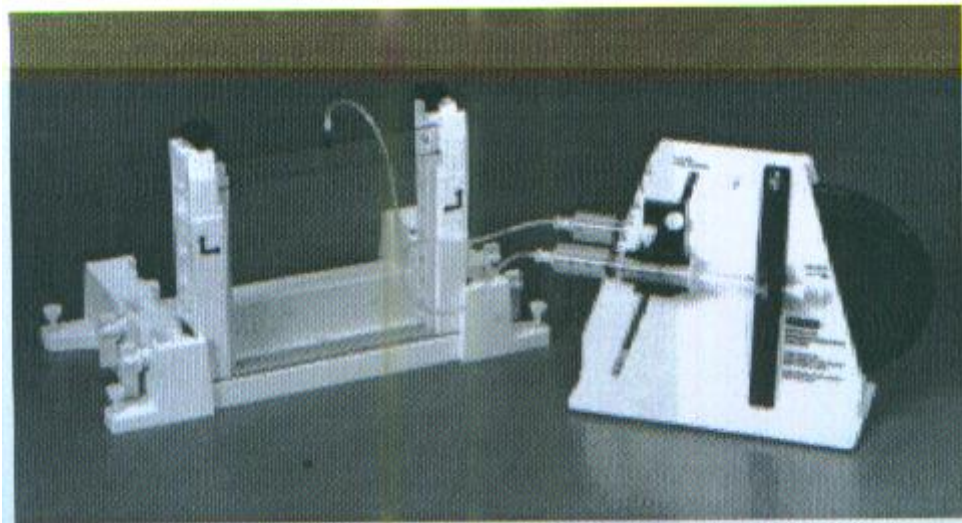


Figura 50. Esquema general del equipo empleado para la técnica de DGGE paralelo.

Tabla XXXV. Acrilamida al 40% 37.5:1	
Reactivo	Cantidad
Acrilamida	38.93 g
Bis-acrilamida	1.07 g
dH ₂ O	Para 100 mL

***Filtrar a través de una membrana de 0.45 μ m y almacenar a 4°C en un frasco ámbar, no más de un mes.

Tabla XXXVI. Soluciones desnaturalizantes de urea y formamida				
Reactivo	25%	30%	60%	70%
Acrilamida 40%	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL
Buffer TAE 50X	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Formamida	10 mL	12 mL	24	28 mL
Urea	10.5 g	2.6 g	25.2	29.4 g
dH ₂ O	cbp 100 mL			

*** Desgasificar durante 10-15 min. Filtrar a través de una membrana de 0.45 μ m y almacenar a 4°C en un frasco ámbar hasta por un mes. Concentración final de acrilamida 8%, ideal para separar amplicones de 200-400pb.

TablaXXXVII. Buffer TAE 50X		
Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tris base	242.0 g	2M
Ácido acético glacial	57.1 mL	1M
EDTA 0.5M, pH 8.0	100.0 mL	50mM
dH ₂ O	Para 1L	

***Posterior a la mezcla, esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

Tabla XXXVIII. Persulfato de amonio (APS) al 10%	
Reactivo	Cantidad
APS	0.05 g
dH ₂ O	500 μ L

***Se prepara al momento de utilizarlo. No se recomienda almacenarlo, adicionar 50 μ L y 10 μ L de TEMED a 20 mL de solución desnaturalizante, tiempo de polimerización 1hr.

Reactivo	Cantidad
Buffer TAE 50 X	140 mL
dH ₂ O	Para 7 L

***Se recomienda utilizar no más de dos veces, en la electroforesis.

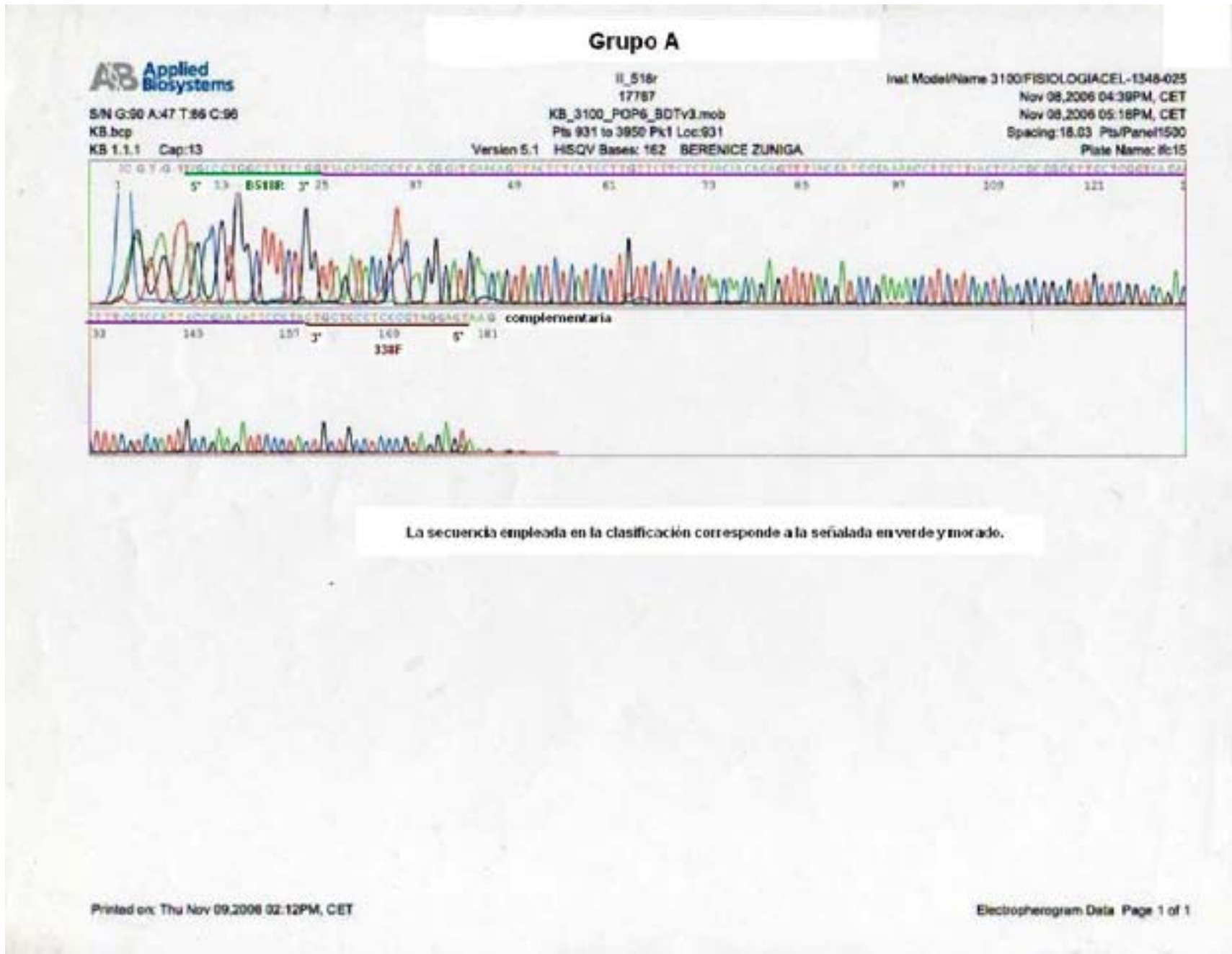
Reactivo	Cantidad
2% de Azul de bromofenol	1.4 mL
2% de Cianol-xilenol	6.0 mL
Glicerol al 100%	7.0 mL
dH ₂ O	Para 20.0 mL

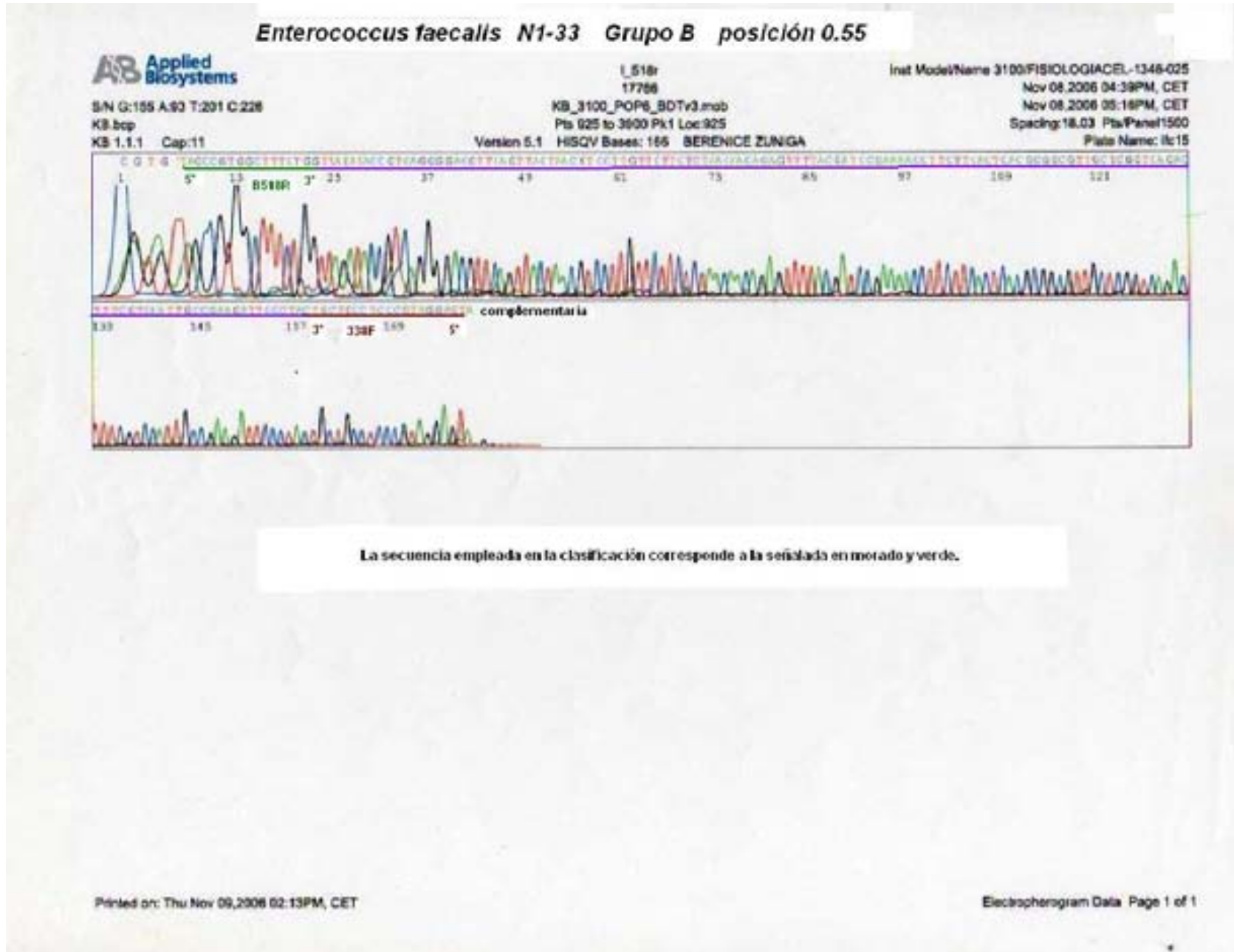
***Se recomienda adicionar 0.25-0.5 µL de buffer de carga por 1µL de amplicón.

No.	Etapa del proceso	Procedimiento	Tiempo de incubación
1	Fijación	Sumergir el gel en la solución fijadora.	30 min. o toda la noche
2	Impregnación con plata	Reemplazar la solución fijadora por la solución teñidora. Incubar.	30 min.
3	Lavado	Reemplazar la solución teñidora por el agua de lavado.	1 min.
4	Revelado	Adicionar la solución reveladora.	6 min.
5	Paro y almacenamiento	Adicionar la solución de paro y almacenamiento 5X.	30 min. o toda la noche

	Reactivo	Formulación
1	Solución fijadora	25 mL de la solución fijadora 5X más 100 mL de etanol al 24%.
2	Solución teñidora	25 mL de la solución teñidora 5X más 100 mL de agua destilada.
3	Solución reveladora	25 mL de la solución reveladora 5X, 125 µL de tiosulfato de sodio y 125 µL de formamida más 100 mL de agua destilada.
4	Solución de paro y almacenamiento	25 mL de la solución de paro y almacenamiento 5X más 100 mL de agua destilada.
5	Agua para lavado	125 mL de agua destilada

ANEXO III. Secuencias de la región V3 del gene ADNr 16S





Grupo C

AB Applied Biosystems

S/N G:115 A:82 T:161 C:178
KB.bcp
KB 1.1.1 Cap:8

VII_518
17772

KB_3100_POP6_BDTv3.mob
Pis 900 to 3929 Pk1 Loc:900

Version 5.1 HISQV Bases: 159 BERENICE ZUNIGA

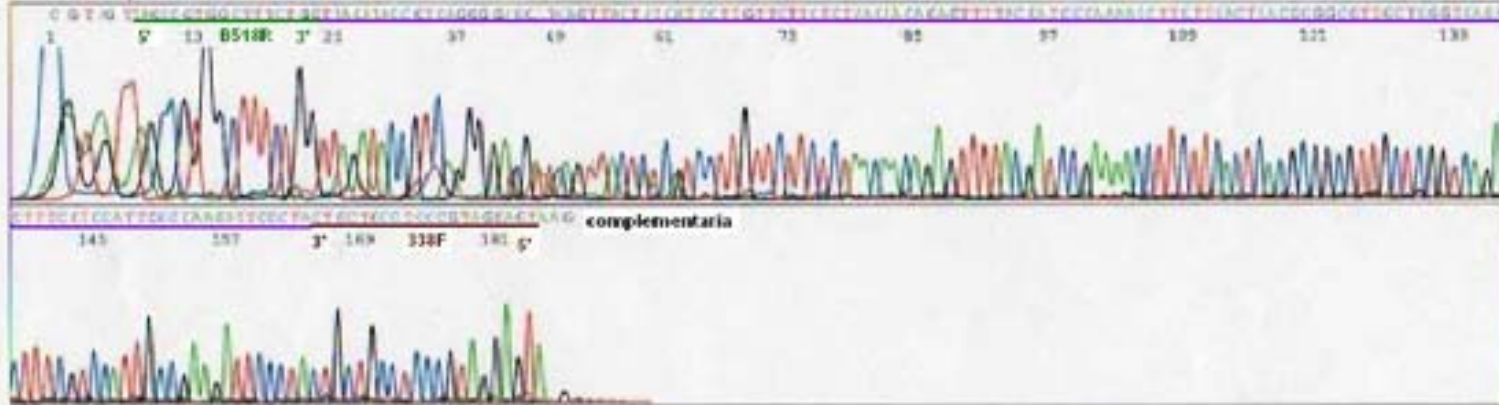
Inst Model/Name 3100FISIOLOGIACEL-1348-025

Nov 08,2006 04:39PM, CET

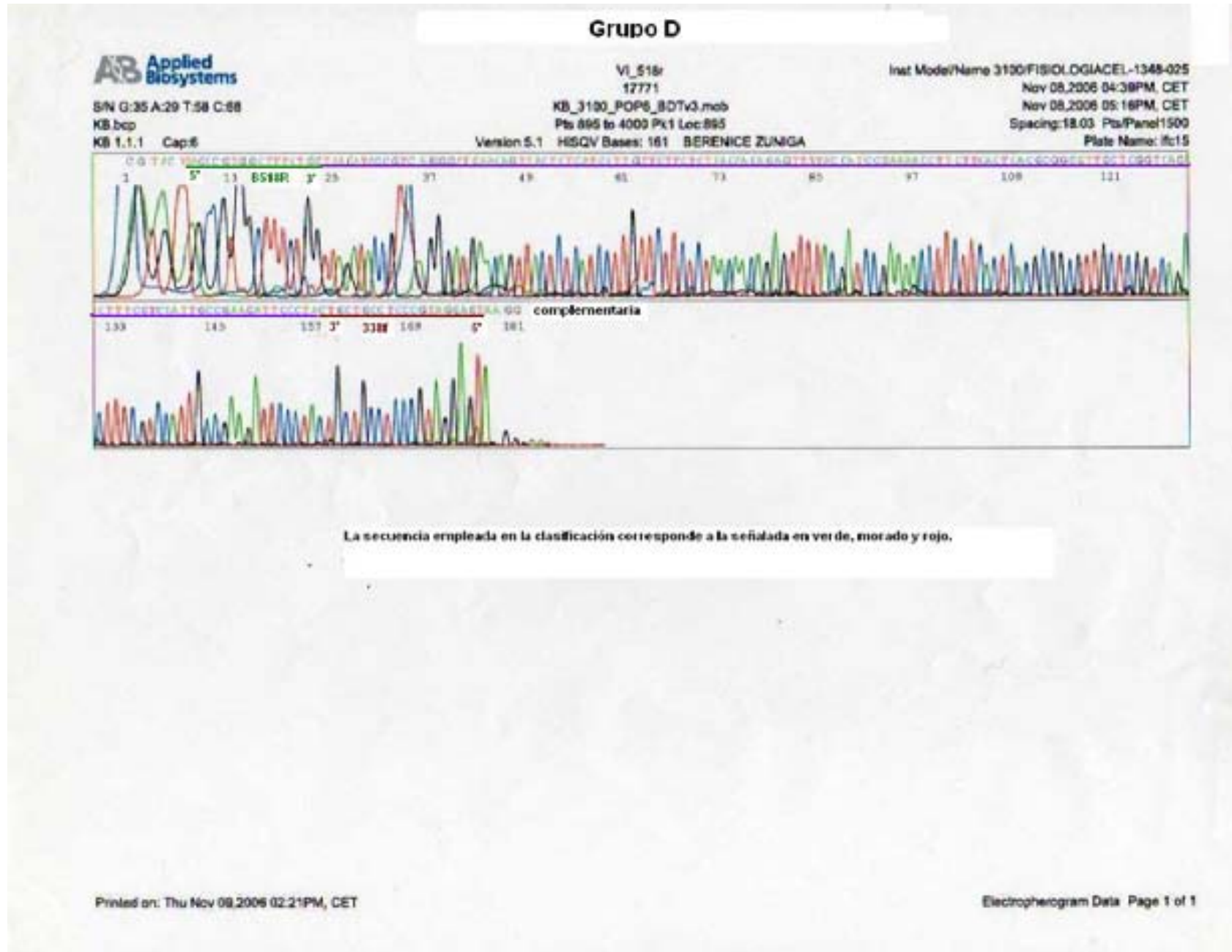
Nov 08,2006 05:16PM, CET

Spacing:18.03 Pis/Panel1500

Plate Name: #c15



La secuencia empleada en la clasificación corresponde a la señalada en verde y morado.



Grupo E

AB Applied Biosystems

S/N G21 A:11 T:26 C:36
KB bcp
KB 1.1.1 Cap:4

V_51R
17770

KB_3100_POP8_BDTv3.mob
Pis 800 to 3500 Pk1 Loc:900

Version 5.1 HISQV Bases: 67 BERENICE ZUNIGA

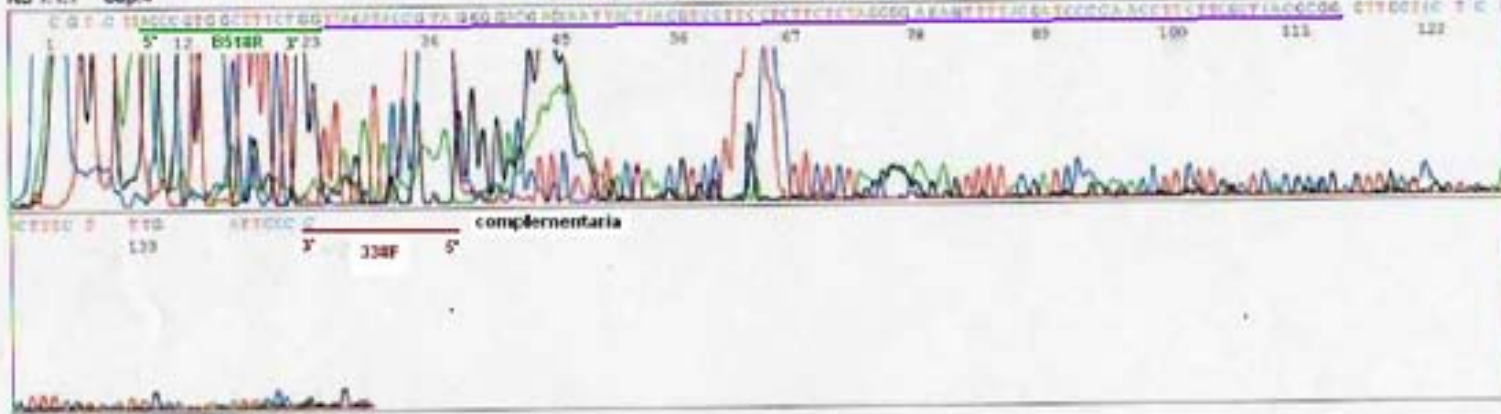
Inst Model/Name 3100/FISIOLOGIACEL-1348-025

Nov 08,2006 04:39PM, CET

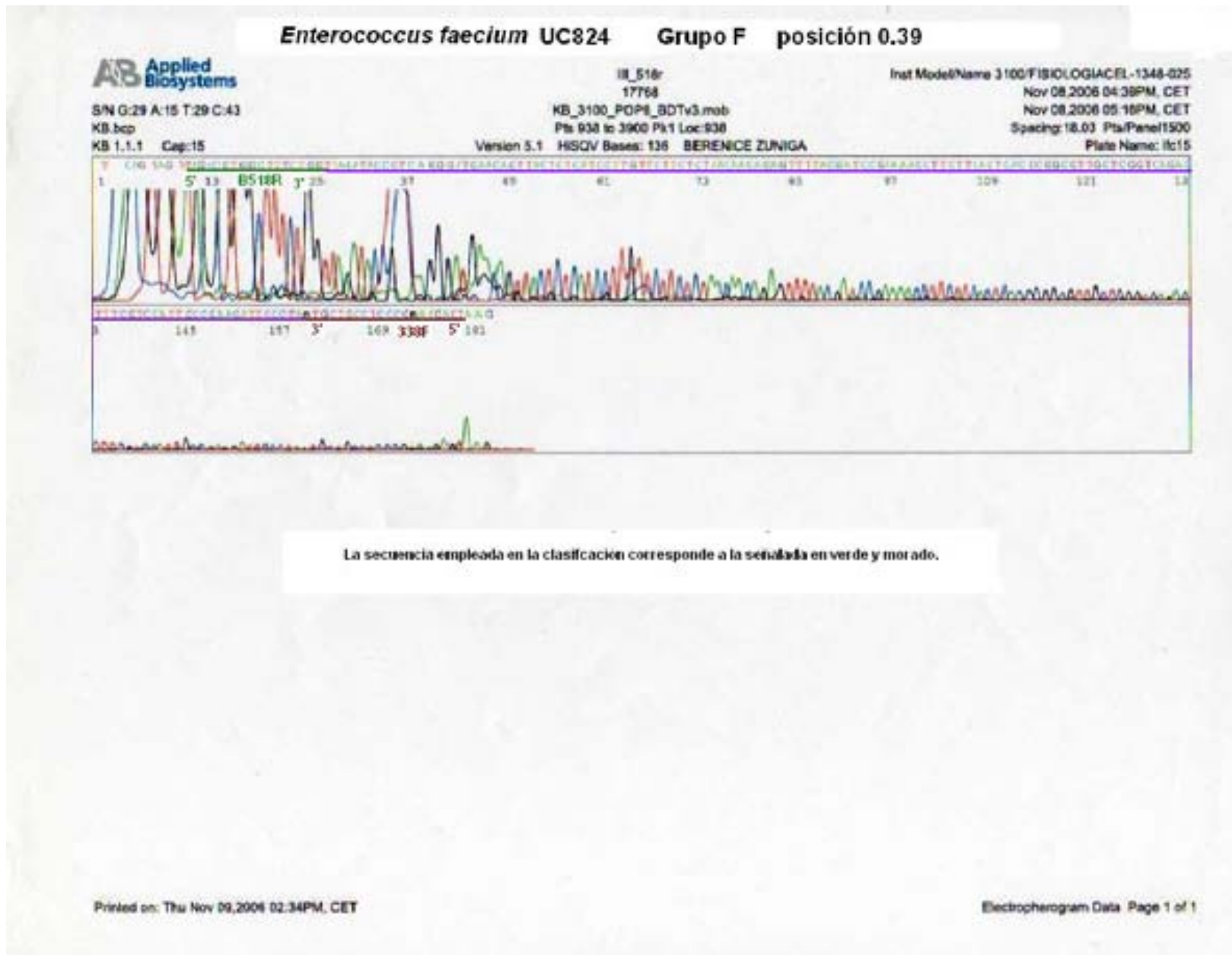
Nov 08,2006 05:16PM, CET

Spacing:16.63 Pts/Panel:1500

Plate Name: R015



La secuencia empleada en la clasificación corresponde a la señalada en verde y morado.



Enterococcus faecalis N1-33 Grupo G posición 0.48

AB Applied Biosystems

S/N G:281 A:254 T:457 C:474
KB.bcp
KB 1.1.1 Cap2

IV_518r
17789

KB_3100_POP8_SDTv3.mob
Pts 918 to 4050 Pk1 Loc:918

Version 5.1 HSCV Bases: 186 BERENICE ZUNIGA

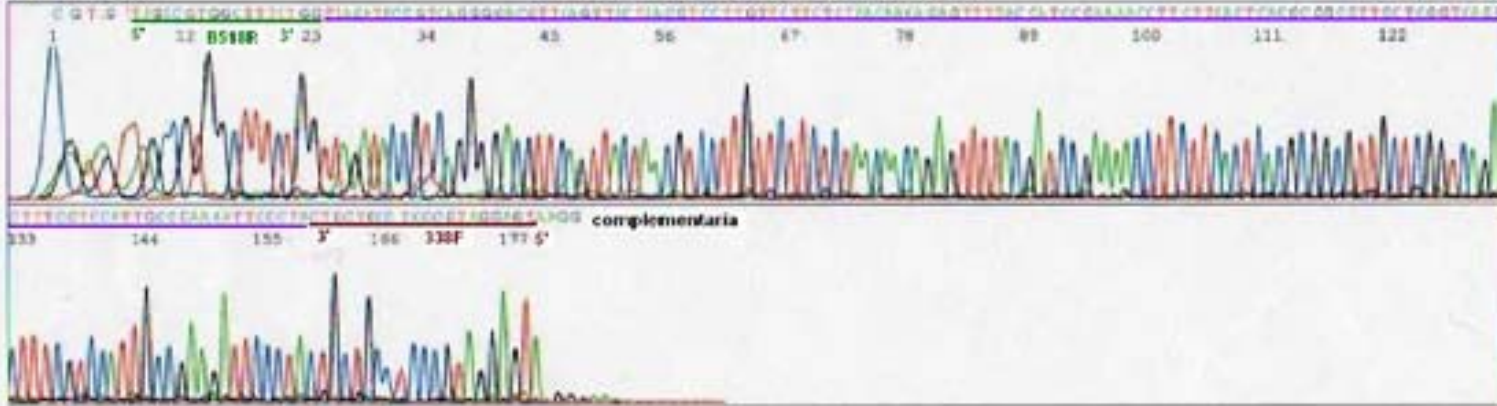
Inst Model/Name 3100/FISIOLOGIACEL-1348-025

Nov 08, 2006 04:39PM, CET

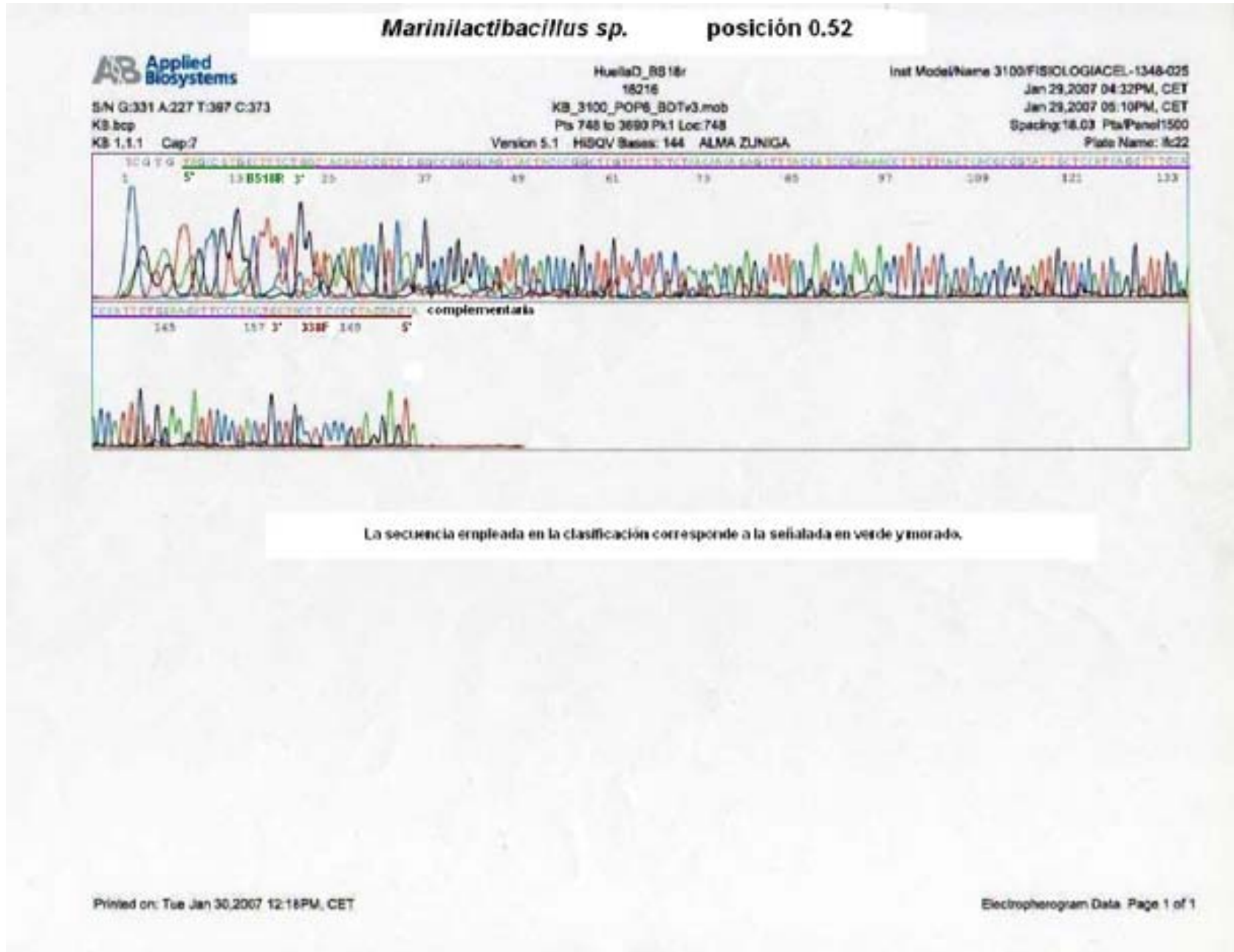
Nov 08, 2006 05:18PM, CET

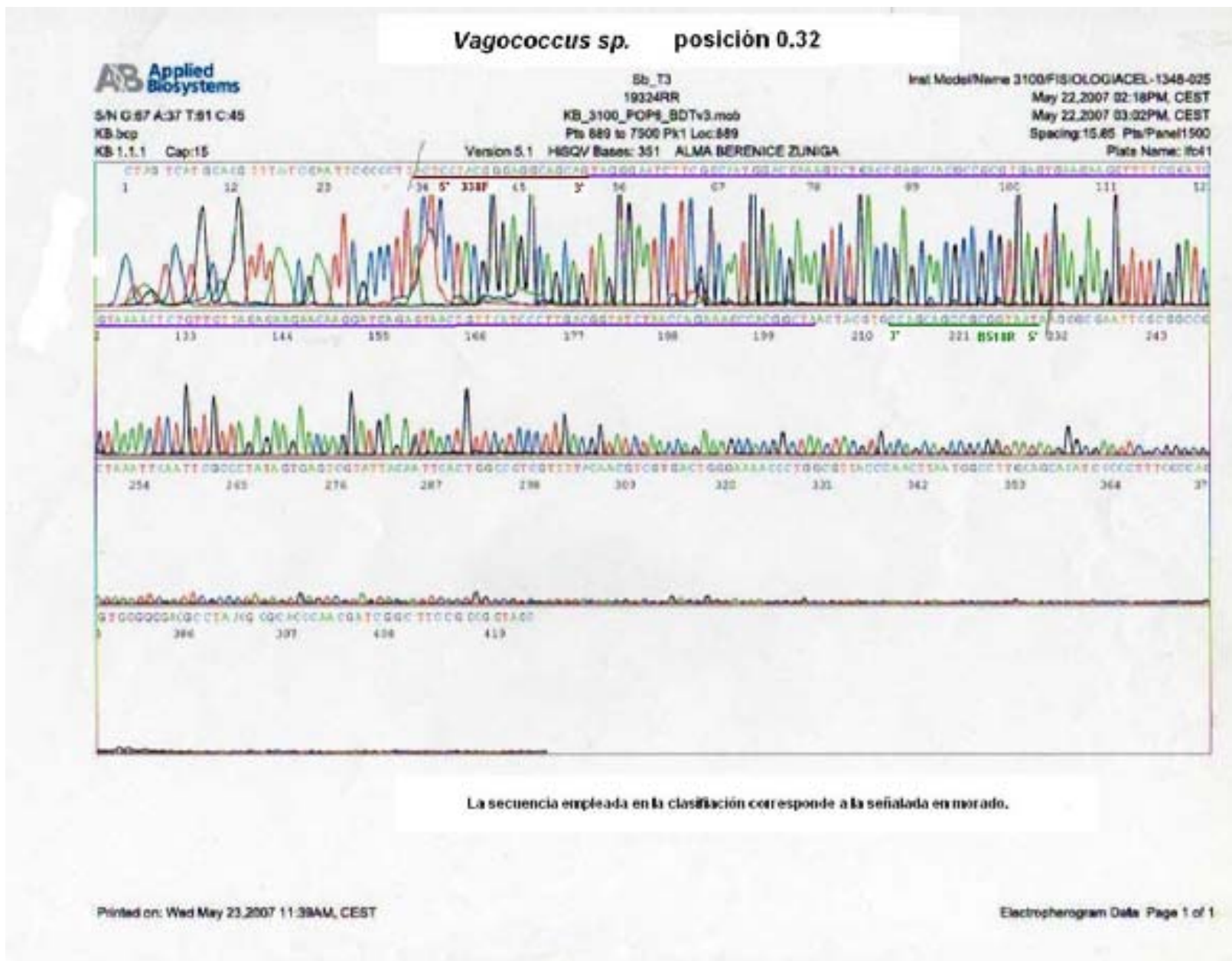
Spacing:18.03 Pts/Panel1500

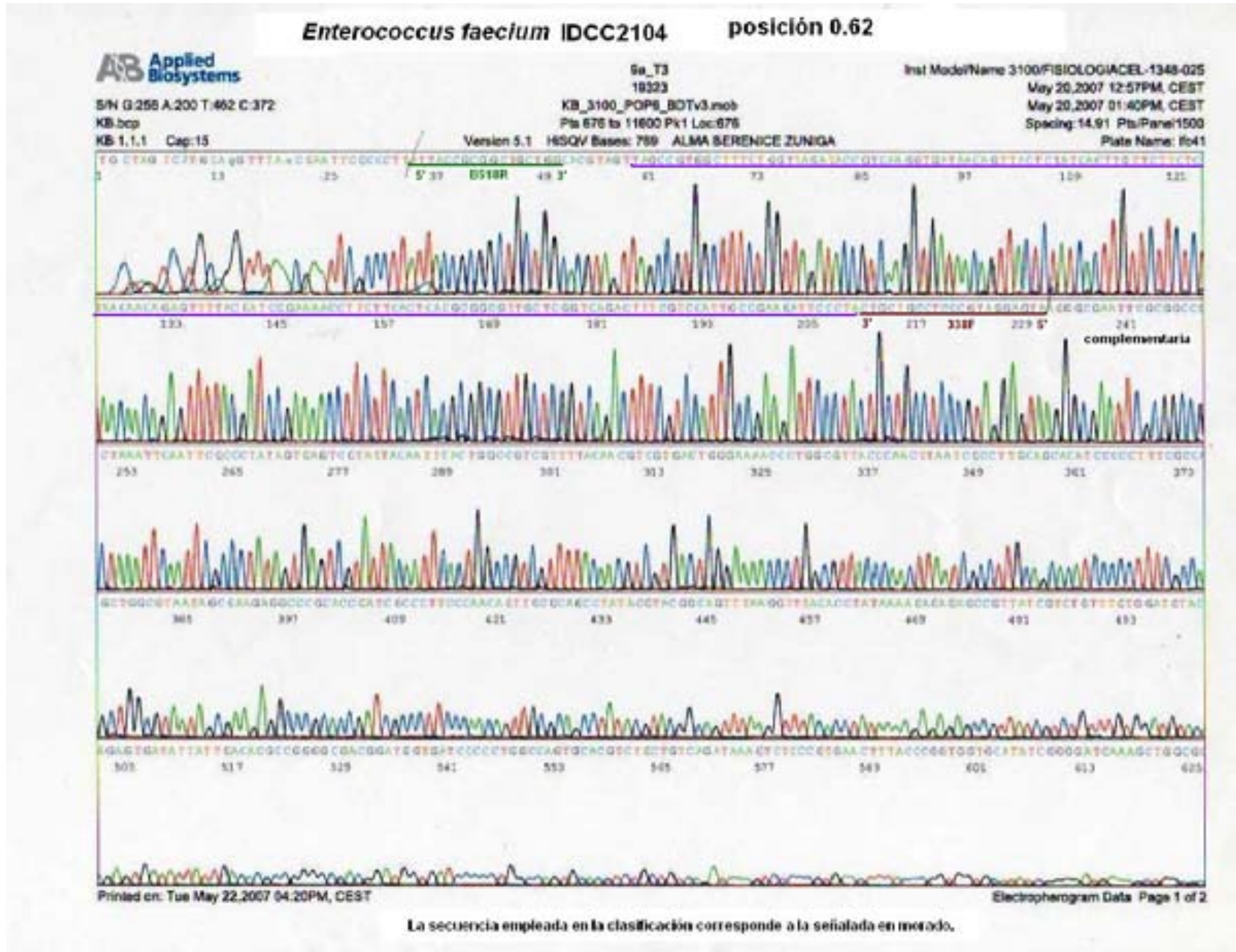
Plate Name: ifc15



La secuencia empleada en la clasificación corresponde a la señalada en verde y morada.







XI. REFERENCIAS.

- Abdelgadir W, Nielsen D, Hamad S, Jakobsen M (2008) A traditional Sudanese fermented camel's milk product, Gariss, as a habitat of *Streptococcus infantarius* subsp. *Infantarius*. *Int J Food Microbiol* 127: 215-19.
- ACNFP (1996) Report on *Enterococcus faecium*, strain K77D. MAFF Advisory Comité on Novel Foods and Processes, Report. Ergon House c/o Nobel House, 17 Smith Square, London SW1 3JR, United Kingdom.
- Aguirre M, Morrison D, Cookson B, Collins M. Phenotypic and phylogenetic characterization of some *Gemella*-like organisms from human infections: description of *Dolosigranulum pigrum* gen. nov., sp. nov.
- Amann R, Ludwig W, Schleiffer K (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cell without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169.
- Ampe F, Ben Omar N, Moizan C, Wachter C, Guyot J (1999) Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentation. *Appl Environ Microbiol* 65:5464-73.
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K (2005) Current protocols in molecular biology John Wiley & Sons, Inc.
- Baleiras-Couto M, Vogels J, Hofstra H, Huis in't Veld J, van der Vossen J (1995) Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: two identification techniques for food-borne yeasts. *J Appl Bacteriol* 79:525-35.
- Barajas R, Barragán E, Chombo P (2005) Reglas de Uso, Marca Colectiva "Queso Cotija Región de Origen". México pp.1-24.
- Benik M, van Overbeek W, Smid E, Gorris L (1999) Biopreservation in modified atmosphere stored mungbean sprouts: the use of vegetable-associated bacteriocinogenic lactic acid bacteria to control the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* 28:226-32.
- Beresford T, Fitzsimons N, Brennan N, Cogan T (2001) Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J* 11:259-74.
- Bolaños S (2004) Variabilidad en la microbiota de diferentes muestras de pozol, determinada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Tesis de maestría, Fac. Química, UNAM.
- Borneman J, Skroch P, O'Sullivan K, Palus J, Rumjanek N, Cansen J, Nienhuis J, Triplett E (1996) Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 62:1938-43.
- Bravo A (2008) Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas del queso Cotija. Tesis de licenciatura, Fac. Química, UNAM.
- Brosius J, Palmer M, Kennedy P, Noller H (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 75:4801-05.
- Buchholz-Cleven B, Rattunde B, Straub K (1997) Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole-cell hybridization. *Syst Appl Microbiol* 20:301-9.
- Cannone J, Subramanian S, Schnare M, Collett J, D'Souza L, Du Y, Feng B, Lin N, Madabusi L, Muller K, Pande N, Shang Z, Yu N, Gutell R (2002) The comparative

- RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intro, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* 3:2.
- Casalta E & Zennaro R (1997) Effect of specific starters on microbiological, biochemical and sensory characteristics of Venado, a Corsican sofá cheese. *Sciences des Aliments* 17:79-94.
- Case R, Boucher Y, Dahllöf I, Holmstrom C, Doolittle F, Kjelleberg S (2007) Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* 73:278-88.
- Centeno J, Menéndez S, Rodríguez-Otero J (1996) Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *Int J Food Microbiol* 33:307-13.
- Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D (2007) A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* 69:330-39.
- Chakravorty S, Pathak D, Dudeja M, Haldar S, Hanif M, Tyagi J (2006) PCR amplification of shorter fragments from the devR (Rv3133c) gene significantly increases the sensitivity of tuberculosis diagnosis. *FEMS Microbiol Lett* 257:306-11.
- Chen X (2008) Analysis of microbial ecology in koumiss in Xinjiang.
- Chen Y, Zhang H, Chen X, Liu W, Airideng C, Yang M, Zhang Y (2007) Submitted Inner Mongolia Agricultural University, Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Zhao Wu Da Street, Huhhot, Inner Mongolia 010018, China.
- Cogan T (2000) Cheese microbiology. In P.F. Fox, T. Guinee, T. M. Cogan, & P.L.H McSweeney (Eds.), *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publisher.
- Collins M, Ash C, Farrow J, Wallbanks S, Williams A (1989) 16S ribosomal ribonucleic acid sequences analysis of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *J Appl Bacteriol* 73:433-37.
- Coppola T, Parente J, Dumontet S, La Peccerella A (1988) The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water buffalo milk. *Lait* 68:295-310.
- Dahllöf I, Baillie H, Kjelleberg S (2000) rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl Environ Microbiol* 66:3376-80.
- Deetae P, Bonnarne P, Spinnler H, Helinck S (2007) Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 1161-71.
- De Rijk P, Neefs J-M, Van de Peer Y, De Wachter R (1992) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research* 20:2175-89.
- Devriese L, Ceysens K, Rodrigues U, Collins M (1990) *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. *FEMS Microbiol Lett* 71: 247-52.
- Devriese L & Pot B (1995) The genus *Enterococcus*. In: Wood B, Holzapfel W (Eds), *The lactic acid bacterial. The genera of lactic acid bacterial*, vol 2. Blackie Academia & Professional, London, United Kingdom, pp. 327-67.
- Del Pozo B, Gaya P, Medina M, Rodríguez-Marín M, Nuñez M (1988) Changes of microflora of La Serena ewe's milk cheese during ripening. *J Dairy Research* 55:449-55.

- De Vuyst L, Foulquié Moreno M, Revets H (2003) Screening for enterocins and detections of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int J Food Microbiol* 84:299-318.
- Díaz G & Wachter C (2003) Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev Latinoa Microbiol* 45:30-40.
- Díaz-Ruiz G, Guyot J, Ruiz-Teran F, Morlon-Guyot J, Wachter C (2003) Microbial and Physiological Characterization of Weakly Amylolytic but Fast-Growing Lactic Acid Bacteria: a Functional Role in Supporting Microbial Diversity in Pozol, a Mexican Fermented Maize Beverage. *Appl Environ Microbiol* 69: 4367-74.
- Duineveld B, Kowalchuk G, Keijzer A, van Elsas J (2001) Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 67: 172-78.
- El-Baradei G, Delacroix-Buchet A, Ogier J-C (2007) Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional egyptian domiati cheese. *Appl Environ Microbiol* 73:1248-55.
- Ercolini D (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56:297-314.
- Ercolini D, Hill P, Dodd C (2003) Bacterial community structure and location in stilton cheese. *Appl Environ Microbiol* 69:3540-48.
- Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S (2001a) Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of important lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Curr Microbiol* 42:199-202.
- Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S (2001b) The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and cultural-independent analyses. *Syst Appl Microbiol* 24:610-17.
- Fasoli S, Marzotto M, Rizzotti L, Rossi F, Dellaglio F, Torriani S (2003) Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int J Food Microbiol* 82:59-70.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-91.
- Ferrari V & Hollibaugh J (1999) Distribution of microbial assemblages in the central Arctic ocean basin studied by PCR/DGGE: analysis of a large data set. *Hydrobiologia* 401:55-68.
- Fesefeldt A & Gliesche C (1997) Identificación of *Hyphomicrobium* spp. using PCR-amplified fragments of the *mxoF* gene as a molecular marker. *Syst Appl Microbiol* 20:387-96.
- Feurer C, Irlinger F, Spinnler H, Glaser P, Vallaeyts T (2004) Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *J Appl Microbiol* 97: 546-56.
- Fisher S & Lerman L (1983) DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:1579-83.
- Fischer S & Lerman L (1979) Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16: 191-200.

- Flórez A & Mayo B (2006) Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, spanish, blue-veined cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *Int J Food Microbiol* 110:165-71.
- Foulquié-Moreno M, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst (2006) The role and application of *Enterococci* in food and health. *Int J Food Microbiol Rev* 106: 1-24.
- Foulquié-Moreno M, Rea M, Cogan T, De Vuyst L (2003) Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int J Food Microbiol* 81:73-84.
- Fox F P Microbiology of cheese ripening. En: Fundamentals of Cheese Science. Edit Aspen Publishers, Inc. Maryland, EUA. 2000. pp 206-35.
- Franz C, Stiles M, Schleifer K, Holzapfel W (2003) Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol* 88:105-22.
- Franz C, Holzapfel W, Stiles M (1999) Enterococci at the crossroads of food safety?. *Int J Food Microbiol* 47:1-24.
- Gafan G & Spratt D (2005) Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion, An attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. *FEMS Microbiol Lett* 253:303-7.
- Gálvez A, Giménez-Gallego G, Maqueda M, Valdivia E (1989) Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* subsp. Liquefaciens S-48. *Antimicrob Agents Chemother* 33:437-41.
- García V (2006) Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija Tesis de licenciatura, Fac. Química, UNAM.
- Gelsomino A, Kejizer-Wolters A, Cacco G, van Elsas J (1999) Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods* 38:1-15.
- Gelsomino R, Vancanneyt M, Cogan T, Condon S, Swings J, (2002) Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Appl Environ Microbiol* 68:3560-65.
- Gevers D, Cohan F, Lawrence J, Spratt B, Coenye T, Feil E, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson F, Swings J (2005) Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* 3:733-39.
- Ghuri M, Khalid A, Grant S, Heaphy S, Grant W. Phylogenetic analysis and recovery of varied integron-linked genes from a whole range of diverse bacteria isolated from extreme environments.
- Giller K, Beare M, Lavelle P, Izac A, Swift M (1997) Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Appl Soil Ecol* 6:3-16.
- Giraffa G, Lazzi C, Gatti M, Rossetti L, Mora D, Neviani E (2003) Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein coding genes. *Int J Food Microbiol* 82:163-72.
- Giraffa G (2002) *Enterococci* from foods. *FEMS Microbiol Rev* 26:163-71.
- Giraffa G, Neviani E, Torri Tarelli G (1994) Antilisterial activity by enterococci in a model predicting the temperatura evolution of Taleggio, an Italian sofá cheese. *J Dairy Science* 77:1176-82.
- Gunderson J, Sogin M, Wollett G, Hollingdale M, Delacruz V, Waters A, Mccutchan T (1987) Structurally distinct, stage specific ribosomes occur in *Plasmodium*. *Science* 238:933-37.
- Hardie J & Whiley R (1997) Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Appl Microbiol Symposium Supplement* 83:1S-11S.

- Hata T, Alemu M, Kobayashi M, Tanaka R, Sato T, Suzuki C, Nitisinnprasert S, Ohmomo S (02-Feb-07) Identification of enterocin N produced by *Enterococcus faecalis* N-33 isolated from fermented vegetables in Thailand and its application to ready-to-eat foods as a biopreservative.
- Hernández N (2007a) Identificación de cepas proteolíticas aisladas del queso Cotija, un estudio microbiológico y fisicoquímico. Tesis de licenciatura, Fac. Química, UNAM.
- Hernández V (2007b) Queso Cotija: Estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante. Tesis de licenciatura, Fac. Química, UNAM.
- Hoyle L, Lawson P, Foster G, Falsen E, Ohlen M, Grainger J, Collins M (2000) *Vagococcus fessus* sp. nov., isolated from a seal and a harbour porpoise. *Int J Syst Evol Microbiol* 50(3): 1151-54.
- Huang W (1996) Bacterial diversity based on topoisomerase genes. *Ann Rev Genet* 30: 79–107.
- Huang W (1994) Type II DNA topoisomerase genes, in: L.F. Liu (Ed.), *DNA Topoisomerases: Biochemistry and Molecular Biology*. Advances in Pharmacology, vol. 29A, Academic Press, New York. pp 201–225.
- Hugas M, Garriga M, Aymerich M (2003) Functionality of enterococci in meat products. *Int J Food Microbiol* 88:223-33.
- Ishikawa M, Kodama K, Yasuda H, Okamoto-Kainuma A, Koizumi K, Yamasato K (2007) Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. *Lett Appl Microbiol* 44:308-13.
- Ishikawa M, Nakajima K, Yanagi M, Yamamoto Y, Yamasato K (2003) *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:711-20.
- Jensen J, Reinbold G, Washam C, Vedamuthu E (1975a) Role of enterococci in Cheddar cheese: free fatty acid appearance and citric acid utilization. *Journal of Milk and Food Technology* 38:78-83.
- Jensen J, Reinbold G, Washam C, Vedamuthu E (1975b) Role of enterococci in Cheddar cheese: proteolytic activity and lactic acid development. *Journal of Milk and Food Technology* 38:3-7.
- Jimenez E, Fernandez L, Marin M, Martin R, Odriozola J, Nueno-Palop C, Narrad A, Olivares M, Xaus J, Rodríguez J. Isolation of commensal bacteria from umbilical chord blood of healthy neonates born by caesarean section.
- Kasai H, Ezaki T, Harayama S (2000) Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *J Clin Microbiol* 38: 301–8.
- Kayser F (2003) Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int J Food Microbiol* 112:208-14.
- Kelly D, Wood A (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* Gen. Nov and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 511–16.
- Klappenbach J, Saxman P, Cole J, Schmidt T (2001) rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res* 29:181-84.
- Klappenbach J, Dunbar J, Schmidt T (2000) Rrna operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66:1328-33.
- Kowalchuk G, Stephen J, De Boer W, Prosser J, Embley T, Woldendorp J (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in

- coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol* 63:1489-97.
- Kwon H S, Kang B H, Kim T Y (27-Jun-07) A potentially probiotic *Enterococcus* strain that produces lactic acid rapidly.
- La Jornada, <http://www.jornada.unam.mx/2006/11/14/index.php?section=estados&article=037n3est>
- Law-Brown J & Meyers P (2003) *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 683-85.
- Lawson P, Foster G, Falsen E, Ohlén M, Collins M (1999) *Vagococcus lutrae* sp. nov., isolated from the common otter (*Lutra lutra*). *Int J Syst Bacteriol* 49: 1251-54.
- Lee Y & Yang D (2002) Determination of lysozyme activities in a microplate format. *Analytical Biochemistry* 310: 223-24.
- Lonetto M, Gribskov M, Gross C (1992) The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* 174:3843-49.
- Lopes S, Ribeiro T, Abrantes M, Marques F, Tenreiro R, Crespo B (2005) Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of *enterococci*. *Int J Food Microbiol* 103:191-98.
- MacCabe K, Zhang Y, Huang B, Wagar F, McCabe F (1999) Bacterial species identification after DNA amplification with a universal primer pair. *Mol Genet Metab* 66:205-11.
- MacNaughton S, Stephen J, Venosa A, Davis G, Chang Y, White D (1999) Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl Environ Microbiol* 65:3566-74.
- Manolopoulou E, Sarantinopoulos P, Zoidou E, Aktipis A, Moschopoulou E, Kandarakis I, Anifantakis E (2003) Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *Int J Food Microbiol* 82:153-61.
- Maoz A, Mayr R, Scherer S (2003) Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. *Appl Environ Microbiol* 69: 4012-18.
- Marilley L & Casey M (2003) Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int J Food Microbiol* 90:139-59.
- Mathur S & Singh R (2005) Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria a review. *Int J Food Microbiol* 105:281-95.
- Mayilraj S & Saini H. Studies of culturable bacteria from a cold desert of the Indian Himalayas.
- Mendoza F, Maqueda M, Gálvez A, Martínez-Bueno M, Valdivia E (1999) Antilisterial activity of peptide AS-48-adapted strain of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 65:618-25.
- Michel C, Pelletier C, Boussaha M, Douet D-G, Lautraite A, Tailliez P (2007) Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Appl Environ Microbiol* 73: 2947-55.
- Mold-Lawes A (1994) Study of a bacteriophage as a potential gene transfer system for a ruminal bacterium and identification of the host bacteria. Thesis University of Illinois.
- Monnet C, Correia K, Sarthou A-S, Irlinger F (2006) Quantitative detection of *Corynebacterium casei* in cheese by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 72: 6972-79.

- Moore D, Zhouandai M, Ferguson D, McGee C, Mott J, Stewart J (2006) Comparison of 16S rRNA sequencing with conventional and commercial phenotypic techniques for identification of enterococci from the marine environment. *J Appl Microbiol*
- Morey R E, Carvalho M G, Shewmaker P L, Steigerwalt A G, Moore D F, Zhouandai M H, Ferguson D M, McGee C, Mott J B, Stewart J C (2006) Comparison of 16S rRNA sequencing with conventional and commercial phenotypic techniques for identification of enterococci from the marine environment.
- Murray A, Hollibaugh J, Orrego C (1996) Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl Environ Microbiol* 62:2676-80.
- Muyzer G (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 2:317-22.
- Muyzer G & Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:127-41.
- Muyzer G, Teske A, Wirsén C, Jannasch H (1995) Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol* 164:165-72.
- Muyzer G, De Waal E, Uitterlinden A (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700.
- Myers R, Maniatis T, Lerman L (1987) Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 155:501-27.
- Najjari A, Ouzari H, Boudabous A, Zagorec M. Developing a collection of *Lactobacillus sakei* originating from Tunisian seafood and meat products.
- Naser S, Vancanneyt M, Hoste B, Snauwaert C, Vandemeulebroecke K, Swings J (2006) Reclassification of *Enterococcus flavescens* Pompei *et al.* 1992 as a later synonym of *Enterococcus casseliflavus* (ex Vaughan *et al.* 1979) Collins *et al.* 1984 and *Enterococcus saccharominimus* Vancanneyt *et al.* 2004 as a later synonym of *Enterococcus italicus* Fortina *et al.* 2004. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:413-16.
- Nayak S & Kale S. Isolation of anaerobes from main digester of Nisargruna biogas plant.
- Neefs J-C, Van de Peer Y, Hendriks L, De Wachter R (1990) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequence. *Nucleic Acids Research* 18(supplement):2237-317.
- Ntougias S & Russell N (2001) *Alkalibacterium olivoapovliticus* gen. nov., sp. nov., a new obligately alkaliphilic bacterium isolated from edible-olive wash-waters. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1161-70.
- Nubel U, García-Pichel F, Kuhl M, Muyzer G (1999) Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. *Appl Environ Microbiol* 65:422-30.
- Nubel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Weishuber A, Amann R, Ludwig W, Backhaus H (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus*

- polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* 178:5636-43.
- Nuñez M, Rodríguez J, Garcia E, Gaya P, Medina M (1997) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *J Appl Microbiol* 83:671-77.
- Olsen G, Larsen N, Woese C (1991) The ribosomal RNA data base project. *Nucleic Acids Research* 19:2017-21.
- Ogier, Lafarge J-C, Girard V, Rault A, Maladen V, Gruss A, Leveau J-Y, Delacroix-Buchet A (2004) Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 70:5628-43.
- Ohnishi A, Ohba Y, Sawaji T, Kikuchi M, Kitayama Y, Huang X (2005) This organism was isolated from sewage sludge compost.
- Ordoñez J, Barneto R, Ramos M (1978) Studies on Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwissenschaft* 33:609-912.
- Ovreas L, Forney L, Daae F, Torsvik V (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63:3367-73.
- Pace N (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734-40.
- Pantucek R, Sedlacek I, Doskar J, Rosypal S (1999) Complex genomic and phenotypic characterization of the related species *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus piscifermentans*. *Int J Syst Bacteriol* 49:941-51.
- Pérez-Pulido R, Abriouel H, Ben Omar N, Cañamero M, Galvez A (2006) Safety and potential risk of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food Chem Toxicol* 44:2070-77.
- Petersen A, Chadfield M, Christensen J, Christensen H, Bisgaard M (2008) Characterization of Small-Colony Variants of *Enterococcus faecalis* Isolated from Chickens with Amyloid Arthropathy. *J Clin Microbiol* 46: 2686-91.
- Petridis M, Ayala H, Sato K, Marsh T, Bagdasarian M, Walker E (2003) Bacterial community composition of the house fly gut and a comparative analysis with cow feces using 16S rDNA clone sequence libraries.
- Pruksakorn S, Premanode B, Hirunpetcharat C (2003) The isolation of microorganisms from fermented food, fermented herbs and herbs.
- Randazzo C, Torriani S, Akkermans A, de Vos W, Vaughan E (2002) Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol* 68: 1882-92.
- Reps A (1993) Bacterial smear-ripened cheese. In chesse: chemistry, physic and microbiology, major cheese groups, vol.2, 2nd edn. ed. Fox, P. F. pp. 137-72. London, UK:Chapman and Hall.
- Riemann L, Steward G, Fandino L, Campbell L, Landry M, Azam F (1999) Bacterial community composition during two consecutive NE Monsoon periods in the Arabian Sea studied by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of r RNA genes. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* 46:1791-1811.

- Riley L (2004) Analysis of similarity and relatedness in molecular epidemiology. *Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Principles and Practices*. ASM Press, Washington, pp. 91-124.
- Rossello-Mora R, Thamdrup B, Schafer H, Weller R, Amann R (1999) The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions. *Syst Appl Microbiol* 22:237-48.
- Saeta AE, Magdoub MN, Sultan NE, El-Samragy YA (1983) Aerobic mesophilic and psychrotrophic sporeforming bacteria in buffalo milk. *J Dairy Sci* 66: 1228-31.
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-25.
- Sandberg R, Winberg G, Branden C, Kaske A, Ernberg I, Coster J (2001) Capturing whole-genome characteristics in short sequences using a naive Bayesian classifier. *Genome Res* 11:1404-09.
- Santiago I (2007) Detección de la producción de bacteriocinas por microorganismos aislados del queso Cotija. Reporte LABDEA. Facultad de Química, UNAM.
- Sarantinopoulos P, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E (2002) Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristic of Greek Feta cheese. *Int J Food Microbiol* 76:93-105.
- Sarantinopoulos P, Andrighetto C, Georgalaki M, Rea M, Lombarda A, Cogan T, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E (2001a) Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int Dairy J* 11:621-47.
- Sarantinopoulos P, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E (2001b) Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. *Appl Environ Microbiol* 67:5482-87.
- Sato H, Yanagida F, Shinohara T, Suzuki M, Suzuki K, Yokotsuka K (2001) Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during red wine-making in Japan. *FEMS Microbiol Lett* 202:109-14.
- Shede P N, Kanekar P P, Dhakephalkar P K (2006) Buffalo hide microflora.
- Sheffield V, Beck J, Stone E, Myers R (1992) A simple and efficient method for attachment of a 40-base pair, GC-rich sequence to PCR-amplified DNA. *Biol Techniques* 12:386-87.
- Sheffield V, Cox D, Myers R (1989) Attachment of a 40bp G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:232-36.
- Shewmaker P, Steigerwalt A, Morey R, Carvalho M, Elliott J, Joyce K, Barrett T, Teixeira L, Facklam R (2004) *Vagococcus carniphilus* sp. nov., isolated from ground beef. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1505-10.
- Sigma-Aldrich, http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/HMolecular_Biology/Nucleic_Acid_Electrophoresis/Product_Lines/Dyes_and_Stains.html
- Simonetta A, Moragues de Velasco L, Frisón L (1997) Antibacterial activity of Enterococci strains against *Vibrio cholerae*. *Lett Appl Microbiol* 24:139-43.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M. & 10 other authors (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1043–47.
- Stiles M & Holzapfel (1997) lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* 36:1-29.

- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-99.
- Tamura K & Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-26.
- Tanaka N, Nakano M, Okada S (2007) 16S rRNA gene sequences of NRIC Lactic Acid Bacteria strains.
- Teuber M, Perreten V, Wirsching F (1996) Antibiotikumresistente bakterien: eine neue dimension in der lebensmittelmikrobiologie. *Lebensmitteltechnologie* 29:182-99.
- Theunissen J, Britz T, Torriani S, Witthuhn R (2005) Identification of probiotic microorganisms in south african products using PCR-based DGGE analysis. *Int J Food Microbiol* 98:11-21.
- Thompson J, Higgins D, Gibson T (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-80.
- Toffin L, Zink K, Kato Ch, Pignet P, Bidault A, Bienvenu N, Birrien J-L, Prieur D (2005) *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deep sub-seafloor sediment of the nankai trough. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:345-51.
- Toffin L, Webster G, Weightman A, Fry J, Prieur D (2004) Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program. *FEMS Microbiol Ecol* 48: 357-67.
- Torsvik V, Daae F, Sandaa R, Ovreas L (1998) Review article: novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J Biotechnol* 64:53-62.
- Utrera M (2007) Queso Cotija Auténtico: Estudio de la relación de sus características sensoriales, texturales y de color. Tesis de licenciatura, Fac. Química, UNAM pp 42, 79-94,128-133.
- Vancanneyt M, Zamfir M, Devriese L, Lefebvre K, Engelbeen K, Vandemeulebroecke K, Amar M, De Vuyst L, Haesebrouck (2004) *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:2175-79.
- Vancanneyt M, Lombardi A, Andrighetto C, Knijff E, Torriani S, Bjorkroth K, Franz C, Foulquié Moreno M, Revets H, De Vuysts L, Swings J, Kersters K, Dellaglio F, Holzapfel W (2002) Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl Environ Microbiol* 68:1381 -91.
- Van de Peer Y, Chapelle S, De Wachter R (1996) A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res* 24:3381-91.
- Van Hannen E, Gzward P, van Agterveld, Gons H, Ebert J, Laanbroek H (1999) Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Appl Environ Microbiol* 65:795-801.
- Venkateswaran K, Dohmoto N, Harayama S (1998) Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. *Appl Environ Microbiol* 64: 681-87.
- Villani F & Coppola S (1994) Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Annali de microbiologia ed Enzimologia* 44:97-105.
- Villegas A (2004) Tecnología quesera. Capitulo 13. Fichas técnicas. Edit. Trillas Mex. D.F. pp. 316-321.

- Wang C, Yang X, Chen L, Chang H, Liu H, Xu R (2008) Study on 16S rRNA genes in closely related species of Enterococci.
- Wang O, Garrity G, Tiedje J, Cole J (2007) Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73: 5261-67.
- Watanabe K, Nelson J, Harayama S, Kasai H (2001) ICB database: the gyrB database for identification and classification of bacteria. *Nucleic Acid Res* 29: 344-45.
- Watanabe K, Teramoto M, Harayama S (1999) An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. *Appl Environ Microbiol* 65: 2813-19.
- Wilson I (1997) Minireview: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 63:3741-51.
- Wintzingerode F, Gobel U, Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21: 213-29.
- Yamamoto S & Harayama S (1998) Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of gyrB, rpoD and 16S rRNA genes. *Int J Syst Bacteriol* 48: 813-819.
- Yamamoto S & Harayama S (1996) Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of gyrB genes and on the amino acid sequences of their products. *Int J Syst Bacteriol* 46: 506-11.
- Yamamoto S & Harayama S (1995) PCR amplification and direct sequencing of gyrB genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol* 61: 1104-09.
- Yamamoto S, Kasai H, Arnold D, Jackson R, Vivian A, Harayama S (2000) Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of gyrB and rpoD genes. *Microbiology* 146: 2385-94.
- Yamamoto S, Bouvet P, Harayama S (1999) Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on gyrB sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 49: 87-95.
- Yamasato K & Ishikawa M (17-Ene-2006) 16S rRNA gene sequence of *Marinilactibacillus piezotolerans* JCM.
- Yañez M, Catalan V, Apraiz D, Figueras M, Martinez-Murcia A (2003) Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on gyrB gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 875-83.
- Yin H, Cao L, Xie M, Chen Q, Qiu G, Zhou J, Wu L, Wang D, Liu X (2008) Bacterial diversity based on 16S rRNA and gyrB genes at Yinshan mine, China. *Syst Appl Microbiol*
- Zamfir M, Vancanneyt M, Makras L, Vaningelgem F, Lefebvre K, Pot B, Swings J, De Vuyst L (2006) Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Syst Appl Microbiol* 29:487-95.
- Zhao L & Chen C. Molecular taxonomic study on *Enterococcus faecalis*.