



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M  
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA  
MICROBIOTA BACTERIANA DEL QUESO  
COTIJA ELABORADO EN DIVERSAS REGIONES  
DE MÉXICO

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**José Luis Casillas Hernández**

Tutor: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch  
Facultad de Química

MÉXICO, D. F.

Marzo 2013



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.

## RECONOCIMIENTOS

### **Jurado Asignado**

Presidente: Dra. Amelia Farrés González- Saravia  
Vocal: Dra. Romina Rodríguez Sanoja  
Vocal: Dra. Bertha González Pedrajo  
Vocal: Dr. Guillermo Gosset Lagarda  
Secretario: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del Edificio E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch .  
Los recursos para la realización de este trabajo provinieron del proyecto PAPIIT IN230511-2: "Diversidad, potencial biotecnológico e inocuidad de la microbiota del queso Cotija".

### ASESOR

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

### SUSTENTANTE

José Luis Casillas Hernández

## Agradecimientos

Al CONACYT por su apoyo con la beca de posgrados nacionales en el transcurso del programa de maestría

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte y al Dr. Mauricio Trujillo Roldán, por su apoyo, recomendaciones y sugerencias para la mejor realización de este proyecto.

Al Dr. Miquel Gimeno Seco por facilitar el uso del aparato  $a_w$  quick

A la Dra. Gloria Días Ruiz y a la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte por el préstamo del Stomacher.

A los miembros de mi jurado por tomarse el tiempo de recibirme, leer mi tesis y proporcionarme sus correcciones

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi casa tantos años, por enseñarme de orgullo, de mi raza y de mi espíritu.

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas y a la Facultad de Química por darme todas las herramientas para adentrarme a la ciencia, por darme curiosidad científica y a tantos amigos con los que contar.

A la Dra. Maricarmen Quirasco por aceptarme como químico, y apoyarme en todo paso nuevo que daba en todo el proyecto. Por tenerme paciencia y por todos los ánimos.

A la Dra. Carolina Peña por todas sus valiosas observaciones e instrucciones. Por toda la atención que nos brinda en el laboratorio. Por sus años de experiencia.

Al Q.A. Israel García Cano por toda su ayuda al inicio del proyecto, por tratar de que me acoplara al laboratorio y hacer más fácil mi transición a la bioquímica y biología molecular.

A todos el laboratorio 312, a Sergio, Aline, Ximena, Katia, Irma, Mary, a Liliana, Erick, Augusto, Blanca, Isaac, Belén, y a los que se me escapan. Gracias por acompañarme, y hacer más divertida la ciencia.

A Manolo, Stefo y Marianita, por divertirme tanto con ustedes, por darme su confianza y por enseñarme tantas cosas a pesar de ser más chicos que yo.

A Lalo, Myrnita y Paez por enseñarme tanto, por aceptarme como su amigo, por compartir tanto conmigo, dentro y fuera del laboratorio, por reírse conmigo y preocuparse también. Gracias por dejarme ser su amigo.

A Ales, mi hermanita del laboratorio, por ser tantas cosas y no pedir nada a cambio. Por estar ahí cuando te necesito, por haberme hablado desde el primer día, por confiar en mí, por tus abrazos y sonrisas, por los viajes, por tantas cosas. Pero sobretodo por el vínculo para toda una vida.

A Eva, mi amigui, por tantas risas, llantos (más que nada tuyos), malentendidos, terquedades, música, cine, locuras, viajes también, carcajadas, abrazos, triunfos, confesiones, secretos, chismes, flojera, conciertos, fanzines, conocí Ecatepec, pues por todo lo que hace una vida divertida. Gracias mejor amiga.

A mis amigos de la facultad que ya casi no veo, pero están presentes, Archu, Pablo, Ara, Eder, Francisco, Cristo y todos los que se me olvidan.

A mi otra familia Carlos, Pablo y Rafael, ya saben porque.

A mis dos familias Casillas y Hernández por darme todo su apoyo y pláticas en estos años, sobretodo a mi abue, a Gina, a Mims a mis tios Gabriel, Jorge, Gustavo, Daniel y Rocío.

A Claus por ser la mejor hermana a su manera que uno podría querer y necesitar.  
Te voy a extrañar fea

A Luisa. Tendría que hacer toda una tesis interminable para decirte todo por lo que te agradezco. No la escribiré, pero trataré de demostrártelo siempre. Gracias por hacerme sonreír cada día.

Por último a mis papás por ser las mejores personas de mi mundo. Por enseñarme todo, por consentirme, y regañarme. Por tomarse el tiempo de pelearse conmigo y contentarnos después. Gracias por hacerme un hombre de bien.

**You've got to promise not to stop  
when I say when**

**- Foo Fighters**

**Dedicatoria**

A mis papás  
A mi zombie

# Índice

<b>I. Resumen.....</b>	<b>2</b>
<b>II. Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>III. Marco Teórico.....</b>	<b>4</b>
<i>Queso Cotija.....</i>	<i>5</i>
<i>Caracterización Fisicoquímica.....</i>	<i>6</i>
<i>Análisis de composición.....</i>	<i>7</i>
<i>Estudio de la ecología microbiana en los quesos.....</i>	<i>8</i>
Técnicas moleculares .....	9
Selección de gene blanco .....	12
a)16SADNr.....	12
b) <i>rpoB</i> .....	13
<b>IV. Antecedentes.....</b>	<b>15</b>
<b>V. Justificación.....</b>	<b>18</b>
<b>VI. Hipótesis.....</b>	<b>18</b>
<b>VII. Objetivo General.....</b>	<b>18</b>
<b>VIII. Objetivos Particulares.....</b>	<b>18</b>
<b>IX. Estrategia Experimental.....</b>	<b>19</b>
Análisis Fisicoquímico .....	20
Análisis Proximal.....	21
Análisis de la microbiota.....	22
<b>X. Resultados y Discusión.....</b>	<b>27</b>
Determinación de Parámetros Fisicoquímicos.....	28
Deeterminación de Macrocomponentes.....	32
Análisis de la microbiota.....	38
a)Extracción de ADN.....	38
b)Amplificación.....	39
c)DGGE.....	42
d)Análisis digital de geles y secuenciación de bandas.....	48
<b>XI. Conclusiones.....</b>	<b>74</b>
<b>XII. Perspectivas.....</b>	<b>75</b>
<b>XII. Anexos.....</b>	<b>76</b>
<b>XIII. Bibliografía.....</b>	<b>105</b>

## Resumen

El queso Cotija es un producto lácteo artesanal de mucha tradición, elaborado desde hace más de 400 años en la Sierra de Jalmich, una región que comprende varios municipios que se encuentran entre los límites de los estados de Jalisco y Michoacán, México. En la zona sureste de México también se obtiene un producto similar.

El Cotija elaborado en la región de la Sierra de Jalmich es un queso que está en vías de obtener la denominación de origen, para lo cual la Asociación Regional de productores de Queso Cotija publicó las “Reglas de uso” con las que se apoya al productor, en un esfuerzo por estandarizar el proceso de manufactura e iniciar su protección oficial. Una de las razones de esta búsqueda es protegerse contra la competencia de quienes usan el nombre pero no necesariamente obtienen un producto igual. Por lo tanto, es importante conocer las similitudes y diferencias con un queso considerado del mismo tipo por quienes lo elaboran en otras regiones. En este trabajo se procedió a la comparación de muestras de queso Cotija elaboradas en la región de la Sierra de Jalmich y las elaboradas en la parte sureste del país, específicamente en Chiapas. Se llevaron a cabo estudios sobre el proceso de fabricación, composición y características fisicoquímicas, además de un estudio de la microbiota con técnicas moleculares.

Se encontraron diferencias marcadas en los procesos de manufactura, que inciden en las características generales de ambos tipos de quesos. Éstas van desde el tipo de ganado, la leche que se utiliza para la elaboración del producto, el cuajo utilizado, el método de ordeña, la sal que se utiliza, hasta el tiempo de maduración de los quesos. En las características fisicoquímicas hay una clara distinción estadística entre los productos de las dos regiones, así como en la composición.

A nivel microbiológico, utilizando la técnica del DGGE, se encontraron patrones de bandedo característicos de cada zona, no importando qué gen blanco se utilizara (16S del ADNr o gen *rpoB*). También fue posible distinguir a nivel de poblaciones microbiológicas entre las dos zonas. Cuando se usó como gen blanco 16S del ADNr se encontraron los siguientes microorganismos: *Bacillus sp*, *Virgibacillus pantothenicus*, *Bacillus vietnamensis* y *Vagococcus sp*, que se catalogaron como predominantes. Cuando se utilizó como gen blanco al gen *rpoB* se encontró a *Enterococcus faecium* y *Streptococcus infantarius*, que se presentaban en las dos regiones. *Staphylococcus equorum* y *Streptococcus parasanguinis* solamente se presentaron en la región de la Sierra de Jalmich y *Streptococcus suis* en la región de Chiapas.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que es posible distinguir entre el queso Cotija región de origen y el elaborado en otra zona geográfica si se analiza la características de composición, fisicoquímicas y a nivel microbiológico.

## **Introducción**

El queso Cotija es un queso mexicano auténtico, que ha obtenido reconocimientos nacionales e internacionales. Es producido en su forma artesanal en los estados de Michoacán y Jalisco y, en Chiapas y Tabasco. Se diferencia de otros quesos en que se usa leche cruda de vaca como materia prima, y que en su elaboración no se lleva a cabo ningún proceso térmico.

Típicamente conlleva una maduración de aproximadamente 3 meses, donde la microbiota presente provoca cambios en su composición, así como en sus características fisicoquímicas y organolépticas. Esta microbiota puede provenir de la leche utilizada, la sal adicionada, la manipulación del queso por el productor, o hasta de las características de la zona geográfica donde se produce.

Este queso, específicamente el producido en la Sierra de Jalmich, ubicada entre Jalisco y Michoacán, obtuvo en 2005 la marca colectiva del Queso Cotija región de origen, lo que representa una protección oficial y proporciona al producto una ventaja competitiva en el mercado. Además es un antecedente importante para lograr la obtención de la Denominación de Origen para el producto. En el año 2010 se publicó la norma mexicana para el queso Cotija artesanal madurado, que establece estándares para la elaboración del queso, además de que define ciertos parámetros en cuanto a sus componentes macromoleculares y fisicoquímicos. Estas características han sido estudiadas a fondo en el grupo de trabajo.

Es de nuestro interés realizar una comparación entre quesos de diferentes regiones, que se denominan Cotija y se dice son producidos de forma artesanal a nivel de componentes, características fisicoquímicas y diversidad microbiana, con respecto a los producidos en la región de Jalmich, protegidos por la marca colectiva. Por esto se plantea hacer una caracterización tanto de muestras de queso Cotija obtenidas de la sierra de Jalmich como de muestras de Chiapas, específicamente del municipio de Tonalá, para observar así las diferencias y similitudes.

## Marco Teórico

De acuerdo a la FAO, queso es el producto, fresco o madurado, obtenido del filtrado después de la coagulación de la leche, crema o leche descremada, los cuales cuentan con una gran diversidad de sabores, texturas y formas (Fox *et al*, 2000). Sandine y Elliker (1970) han reportado hasta 1000 variedades de queso diferentes en el mundo.

La manufacturación de estos productos generalmente sigue el mismo protocolo, aunque varios pasos pueden ser modificados para obtener el queso con las características deseadas(Fox *et al*, 2000). En la Figura 1 se presenta el esquema general:

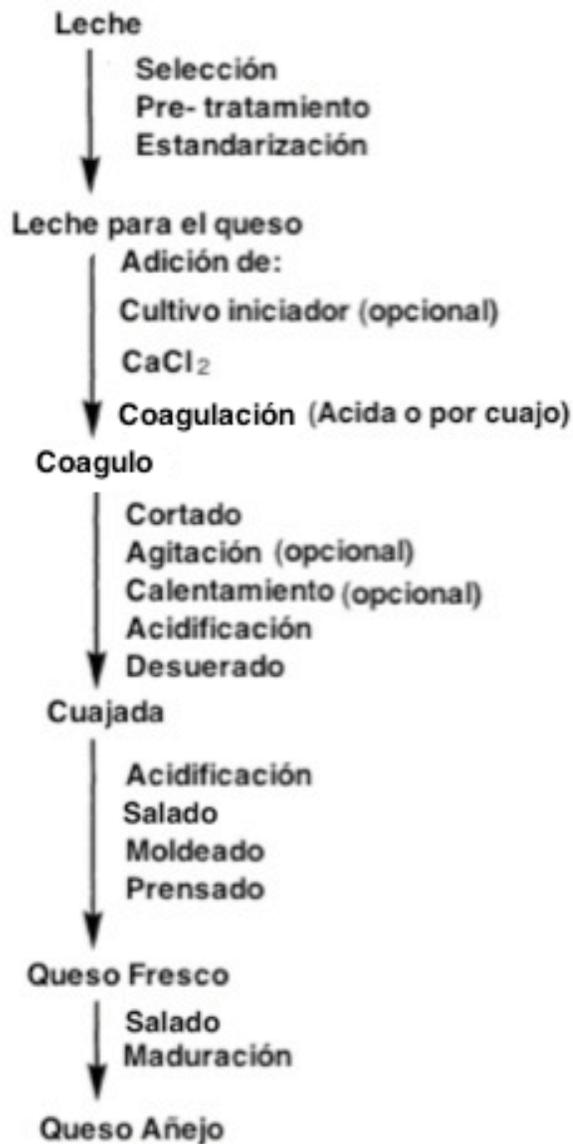


Figura 1. Esquema del proceso de producción (Villegas, 2004)

## **Queso Cotija**

El queso Cotija se produce en su forma artesanal en los estados de Michoacán y Jalisco en la parte central oeste del país, y en Chiapas y Tabasco en la parte sureste. Para su elaboración se utiliza leche cruda de vaca. Es un queso madurado, de pasta dura y con un peso que oscila entre los 20 y 30 kg, que posee una pasta friable, ácida y con un porcentaje de sal aproximado de 6%. Cuando está totalmente madurado presenta un color amarillento y posee un sabor pronunciado seco y fuerte (Alvarez *et al*, 2005) (Figura 2).



Figura 2. Queso Cotija (<http://www.cotija.gob.mx>)

El proceso de manufactura del Queso Cotija depende de cada productor, pero los pasos principales se describen brevemente a continuación.

1. **Ordeña.** La leche empleada debe ser fresca, del día y provenir de vacas ordeñadas durante los meses de lluvia (junio a octubre).
2. **Filtrado.** La leche se pasa por un cedazo limpio para eliminar partículas sólidas.
3. **Adición del cuajo.** Una vez que la leche alcanza la temperatura óptima, entre 20-24 °C, se le adiciona cuajo comercial de origen animal (aprox. 10 mL de cuajo/ 100 L de leche).
4. **Corte del cuajo.** Una vez alcanzada la consistencia deseada, se corta en cuadros de un tamaño aproximado de 1 cm.
5. **Desuerado.** La mezcla del suero y cuajada se deja reposar hasta que la cuajada cortada se asiente en el fondo del recipiente y se separe del suero.

6. **Salado.** La sal es incorporada directamente a la cuajada drenada, es mezclada manualmente; generalmente se emplea sal de grano elaborada artesanalmente en el estado de Colima. La cantidad adicionada varía entre 138 y 140 g por cada 20 L de leche.
7. **Moldeado.** La cuajada se coloca envuelta en yute o ixtle (fibra de maguey) dentro de un molde de acero inoxidable de forma cilíndrica para obtener la presentación tradicional, cuyas dimensiones son 40 cm de diámetro y 18 cm de altura, con un peso de alrededor de 20 kg.
8. **Prensado.** Se realiza durante 18 a 24 horas de manera rústica con piedras de 50 a 90 kg.
9. **Oreado.** La pieza se voltea diariamente hasta que deja de escurrir suero durante 15 días o hasta que adquiere la firmeza necesaria para poder ser manipulada.
10. **Madurado.** El queso se voltea diariamente alternando la cara expuesta al medio durante los 3 primeros meses (Alvarez *et al*, 2005, Cortés Díaz, 2009).

Debido al proceso de manufactura y al origen de la materia prima, el producto puede tener diferentes propiedades, por lo que se ha planteado hacer un estudio que comprenda varios aspectos como los que se muestran a continuación

#### **a) Caracterización fisicoquímica**

El estudio de las propiedades fisicoquímicas de un producto es un reflejo de las condiciones en las cuales se ha manufacturado, además de que si se realiza un estudio de la ecología microbiana paralelo, nos aportaría datos importantes de los microorganismos que se podrían desarrollar en ese medio. Parámetros como la actividad acuosa, cantidad de cloruros y pH, pueden llegar a inhibir o retrasar el crecimiento y el metabolismo de microorganismos, así como también la actividad de algunas enzimas (Eck, 1990).

Actividad acuosa ( $a_w$ )

La actividad acuosa representa la disponibilidad de agua que requiere un sistema para las diferentes reacciones que precisan una fase acuosa. Se calcula de la siguiente forma:

$$a_w = p/p_0$$

Donde  $p$  y  $p_0$  son los valores de la presión de vapor en el sistema y en el agua pura, respectivamente. Debido a la presencia de varios solutos en los alimentos, la presión de vapor en los sistemas alimenticios siempre es menor a la del agua pura.

En el caso de quesos no madurados, la actividad acuosa depende principalmente de la concentración de NaCl en la fase acuosa, mientras que en el caso de quesos madurados, otros compuestos, como ácidos, aminoácidos, péptidos y calcio contribuyen a la disminución de la  $a_w$ , además de la sal (Fox *et al*, 2000)

## Contenido de Sal

La sal se ha utilizado como conservador en los alimentos desde tiempos antiguos y, junto a la fermentación, deshidratación y refrigeración, es uno de los métodos más frecuentes para la preservación de alimentos. Adicionalmente tiene un efecto sobre la maduración del queso. Así pues la medición de la cantidad de cloruros que contiene una muestra (provenientes del cloruro de sodio) es un control importante de la calidad del producto.

La sal en el queso tiene varios efectos que a continuación se mencionan:

- Inhibe o retarda el crecimiento de microorganismos que pueden ser patógenos.
- Inhibe la actividad de varias enzimas presentes en el queso.
- Afecta la sinéresis de la cuajada al reducir la humedad.
- Afecta directamente el sabor del queso.
- También debido a su influencia en la estabilidad de los microorganismos y enzimas, se pueden modificar dichas características sensoriales.
- Altos niveles de sal, pueden producir efectos indeseables en la salud del consumidor (Fox *et al*, 2000).

### ***b) Análisis de composición***

El queso es un alimento rico en nutrientes, cuya composición está definida por parámetros multifactoriales, incluyendo el tipo de leche que se utiliza (especie, crianza, etapa de lactancia, contenido de grasa) y los procesos de manufactura y maduración. Se puede inferir que cada tipo de queso tendrá una composición diferente y quesos similares, producidos en distintas regiones y con algunas diferencias en los métodos de manufactura, tendrán una composición heterogénea. Debido a esto, así como para conocer los parámetros de calidad que caracterizan a cada producto, es importante el estudio de la composición del queso, que se realiza mediante un estudio proximal, el cual determina la cantidad total de cenizas, proteína, carbohidratos, lípidos y humedad, reportados como el porcentaje de composición del producto (Self, 2005).

### Lípidos

Los lípidos desempeñan diversos papeles en el queso: afectan su firmeza, su cohesividad, la sensación al gusto y su sabor. También contribuyen significativamente a las propiedades nutricionales, ya que son un vehículo de vitaminas y fuente de ácidos grasos.

### Proteína

Su concentración puede llegar a variar entre 15% (queso Feta) y 40% (queso Parmesano), dependiendo en la variedad del queso. La proteína predominante en el queso es la caseína, ya que la mayoría de las albúminas y globulinas son perdidas en el desuerado. En la maduración del queso típicamente hay un

rompimiento progresivo de esta proteína por enzimas de la leche, por el curado y por enzimas bacterianas. Este proceso, que es esencial para el desarrollo del sabor, olor y textura, también incrementa la digestibilidad de la proteína del queso hasta un valor cercano de 100%.

#### Carbohidratos

El queso contiene únicamente trazas de carbohidratos residuales, principalmente lactosa. La lactosa residual en el cuajo es normalmente fermentada a ácido láctico por bacterias iniciadoras durante la manufactura y maduración.

#### Humedad

La humedad en este alimento afecta el desarrollo de microorganismos. Además tiene que ver en el tiempo de maduración del queso, así como en aspectos como dureza o textura. Este parámetro está totalmente relacionado con el valor de  $a_w$ .

#### Cenizas

El queso también es una fuente importante de diversos micronutrientes minerales incluido el calcio, el fósforo y el magnesio. Es particularmente una buena fuente de calcio biodisponible, ya que muchos quesos pueden llegar a contener hasta 800 mg de calcio por cada 100 gramos de queso (Fox *et al*, 2000).

### ***c) Estudio de la ecología microbiana en los quesos***

La microbiología de alimentos se ha enfocado en el estudio o la detección de ciertos grupos de microorganismos, pero recientemente se ha visto la necesidad de tomar en cuenta al ecosistema completo, ya que el crecimiento, la sobrevivencia y la actividad de cualquier especie pueden estar determinados por la presencia de otras especies.

Durante el siglo pasado se dependió, casi en su totalidad, del aislamiento y cultivo de los microorganismos para su identificación (Adekambi *et al*, 2009). Pero en los años recientes la microbiología molecular aplicada ha tenido un importante auge, y es un área que progresa rápidamente. Una de las ramas de esta disciplina está relacionada con el desarrollo de métodos moleculares para la identificación y monitoreo de microorganismos en ecosistemas naturales (Ercolini, 2004). Por lo que estudios a nivel de comunidades ahora se apoyan más en estos métodos que son independientes de cultivo. Se basan en el análisis de ADN o del ARN, extraído directamente del sustrato para poder estudiar la diversidad total del microambiente en un solo paso.

La mayoría de estos métodos usan la reacción en cadena de la polimerasa, para amplificar regiones del ADN que aporten información taxonómica.

## Técnicas moleculares

### PCR

Un método poderoso, distinto de la clonación, para amplificar segmentos particulares de ADN, es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Este procedimiento es llevado a cabo bioquímicamente usando la enzima ADN polimerasa la cual adiciona nucleótidos al extremo 3' en un oligonucleótido diseñado cuando es alineado a un templado de ADN, generando una región extendida de ADN de doble hélice. En la Figura 3 se ejemplifica el proceso completo.

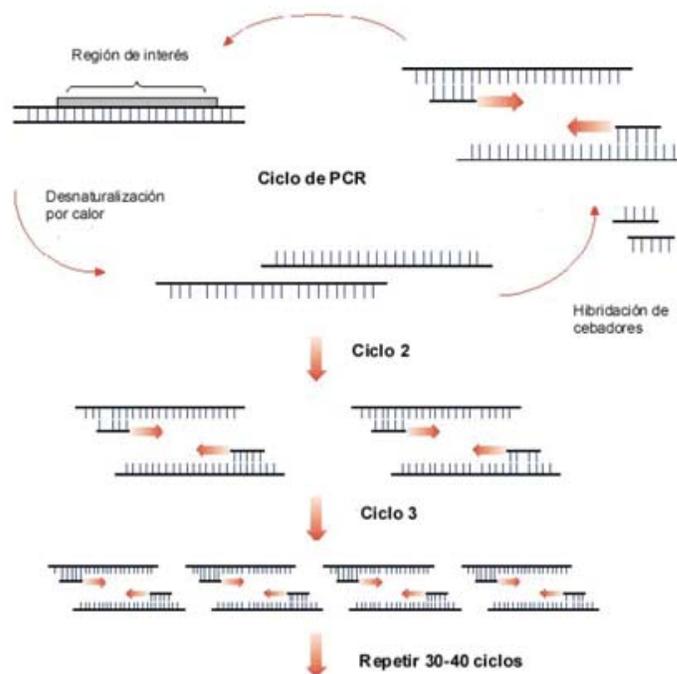


Figura 3. Proceso de la PCR

La PCR también conlleva ciertos problemas como son:

- Inhibición de la amplificación por contaminantes
- Amplificación diferencial
- Formación de artefactos de la PCR
- ADN contaminado (Wintzingerode, 1997)

Otro aspecto a considerar es que ya que es una herramienta muy poderosa diversas técnicas de análisis molecular se basan en la PCR. Algunas de estas son:

- RAPD (Análisis de ADN polimórfico amplificado al azar). Consiste en amplificar al azar regiones de ADN extraído de los microorganismos, para posteriormente separarlos mediante electroforesis en geles de agarosa y

obtener patrones de fragmentos de ADN de diferente tamaño para realizar análisis de similitud y construir dendrogramas.

- AFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados). Se basa en la amplificación por PCR de fragmentos de restricción de ADN genómico. Posteriormente se separan los fragmentos por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida. Se obtienen patrones de 50 a 100 fragmentos con mucha reproducibilidad para realizar los análisis.
- ARDRA (Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado). Se basa en la obtención de ADNr mediante PCR usando cebadores universales, el producto se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos se analizan en geles de agarosa. El patrón de bandeo puede ser usado para la discriminación a nivel de género (Wacher *et al.* 2003).

Todas las técnicas (incluyendo a la DGGE) que se basan en el uso de la PCR conllevan las ventajas y desventajas inherentes a la misma.

### DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante)

Es un método electroforético capaz de separar fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con diferentes secuencias, debido a que pueden migrar en un gel con gradiente desnaturizante basados en su perfil diferencial de desnaturización. Esto es que, una vez que un fragmento llega a su condición desnaturizante cambia de una molécula helicoidal a una parcialmente desnaturizada, y la migración en el gel se detiene. La variación en las secuencias de los fragmentos de ADN es lo que causa que las condiciones de desnaturización varíen de amplicón en amplicón. La desnaturización parcial se puede alcanzar si se agrega una secuencia rica en GC (grapa GC) en el extremo 5' del cebador. La secuencia rica en GC actúa como un dominio con una alta  $T_m$ , previniendo así que las dos cadenas de ADN se disocien completamente en el gel (Muyzer *et al.*, 1998). En la Figura 4 se muestra un esquema de una electroforesis.

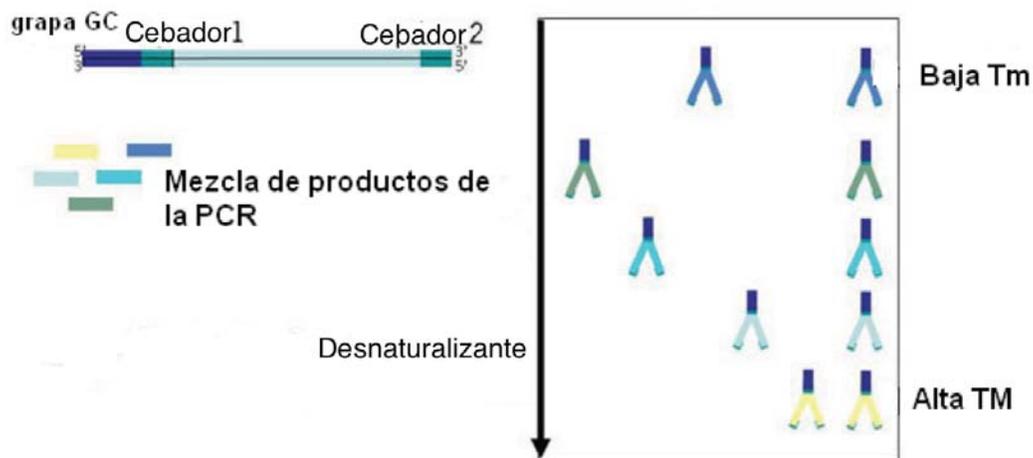


Figura 4. Diagrama de DGGE paralelo

En este tipo de electroforesis las condiciones de desnaturalización están dadas por urea y formamida, donde una solución 100% desnaturalizadora consiste en urea 7M y 40% de formamida en amortiguador (Ercolini, 2004). El comportamiento en el gel de los fragmentos de ADN, así como el gradiente óptimo pueden ser determinados experimentalmente con geles con gradiente perpendicular. Estos geles tienen un gradiente creciente de desnaturalizantes de izquierda a derecha, perpendicular a la dirección de la electroforesis. La muestra es aplicada en todo el ancho del gel y se corre la electroforesis por 3 horas a 200 volts. Después de teñir el gel, el patrón electroforético aparecerá como una curva sigmoidea. Tal comportamiento se explica porque las moléculas de ADN en el lado izquierdo del gel, donde la concentración de desnaturalizantes es baja, migrarán como ADN de doble cadena. En el otro lado del gel, donde la concentración de los desnaturalizantes es alta, las moléculas se separarán en cuanto entren al gel y ahí se detendrán. En concentraciones intermedias, las moléculas tendrán diferentes grados de separación y por lo tanto diferentes grados de movilidad. Una transición pronunciada en movilidad ocurrirá a la concentración de desnaturalizante correspondiente a la temperatura de desnaturalización del dominio más bajo de desnaturalización del fragmento. En la Figura 5 se muestra un esquema de un gel perpendicular. Una vez obtenido el comportamiento migratorio y el gradiente óptimo para la separación, se utiliza un gel paralelo para obtener la separación óptima de bandas en la electroforesis. Este gel tiene un gradiente creciente seleccionado en concentración creciente de desnaturalizantes de arriba hacia abajo (Muyzer *et al*, 1998).

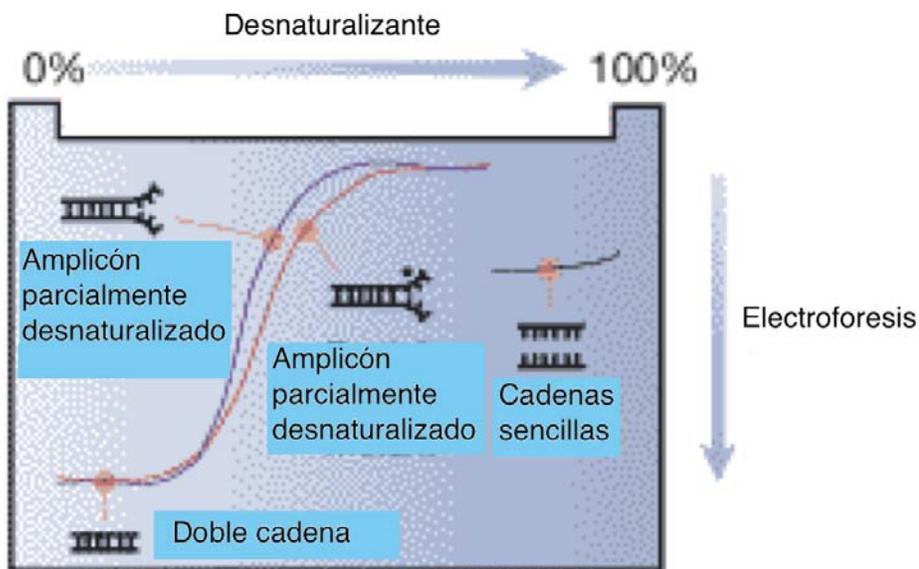


Figura 5. DGGE perpendicular

Un problema que se ha suscitado al usar la técnica de DGGE es la aparición de múltiples bandas que migran diferencialmente, pero que al ser secuenciadas muestran la misma identidad. Parece ser un problema causado por la heterogeneidad del gen blanco predominante en los estudios de comunidades microbianas, el gen 16S ADNr (Wacher *et al*, 2003). Esta heterogeneidad intra especie es el resultado de la presencia de múltiples copias del gen ribosomal y del

hecho que las copias de este gen han evolucionado de manera diferente dependiendo de la posible adaptación que el individuo haya sufrido. De igual forma se debe tomar la deriva génica inherentes del proceso de evolución. Es por esto que, en algunos casos, el fragmento amplificado del gen 16S del ADN<sub>r</sub> aparecerá como varias bandas en un gel de DGGE, en lugar de aparecer sólo como una banda representativa de una especie en particular.

De igual forma se ha observado que la heterogeneidad mostrada por el gen 16S del ADN<sub>r</sub> es típica de las bacterias aisladas del ambiente, lo que implica que la aparición de bandas diferentes en el análisis de los productos de la PCR del 16S ADN<sub>r</sub> de las mezclas de comunidades puede mostrar, además de la diversidad de especies, la diversidad de una secuencia, donde se incluye la variación intra especies (Dahllof *et al*, 2000).

### **Selección de gen blanco**

La región o gen blanco debe cumplir ciertos criterios para poder ser confiable y útil como cronómetro de evolución. Esto es, debe estar presente en todos los organismos a comparar, su tasa de cambio debe de ser suficientemente lenta para comparar todas las especies y su tamaño debe de ser lo suficientemente largo para garantizar una alta confiabilidad en los resultados de análisis filogenéticos (Klenk *et al*, 1994). Dos de los genes blancos más utilizados son el 16S del ADN<sub>r</sub> y el gen *rpoB*

### **16S ADN<sub>r</sub>**

Desde el artículo de Woese y Fox en 1977, la mayoría de los estudios de comunidades microbianas se han enfocado en el análisis de ADN<sub>r</sub>. Esto fue debido a que pudieron catalogar diferentes secuencias de ARN de distintos microorganismos con ayuda de la subunidad 16S. Esta forma de ARN permitió realizar una comparación a nivel de evolución de los distintos individuos, ya que, era un gen altamente conservado y cumplía con los criterios antes mencionados. La subunidad 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1,500 pares de bases, codificado por el gen denominado ADN ribosomal 16S (Rodicio *et al*, 2004). En la Figura 6 se presenta el esquema de la subunidad 16S del ADN<sub>r</sub>.

El gen 16S de ADN<sub>r</sub> de las bacterias está compuesto de nueve regiones (V1- V9), que exhiben una considerable variación en las secuencias entre diferentes especies. Estas regiones hipervariables están generalmente flanqueadas por secuencias conservadas que sirven como “anclas” para pares de cebadores universales o específicos. Estos cebadores se llegan a utilizar para identificación de especies y permiten la evaluación de la diversidad de una comunidad. En el caso de la sistemática molecular la región que ha sido usada más extensivamente ha sido la región V3 (Jany *et al*, 2008).

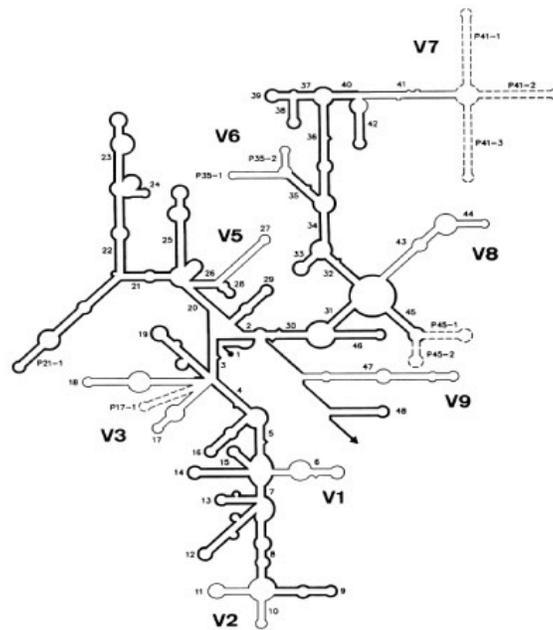


Figura 6. 16S ADNr (Rodicio, 2004)

### ***rpoB***

La ARN polimerasa es una enzima crucial en el proceso transcripcional. En las bacterias, esta polimerasa (de aproximadamente 400kDa) es responsable de sintetizar mRNA, rRNA y tRNA. Su núcleo consiste de 5 subunidades, incluyendo un dímero  $\alpha$  ( $\alpha_2$ ), una subunidad  $\beta$ , una subunidad  $\beta'$  y una subunidad  $\omega$ . Estas subunidades son convertidas en una holoenzima después de la unión de un factor sigma  $\sigma$ , que inicia la transcripción de promotores. La función catalítica de la ARN polimerasa se lleva a cabo por la subunidad  $\beta$ , que es codificada por el gen *rpoB* (Adekambi *et al*, 2009). En la Figura 7 se muestra el esquema de las subunidades de la ARN polimerasa.

Morse y colaboradores, en el año 2010, fueron los primeros que demostraron la universalidad del gen *rpoB* en las bacterias, con lo cual se cumple el primer requisito para ser considerada como reloj molecular. En cuanto a su tasa de cambio, la subunidad  $\beta$  es uno de los componentes más importantes del aparato transcriptor y por lo tanto limitado a evolucionar. El tamaño del gen *rpoB*, estpa entre 3411 pares de bases (*Staphylococcus aureus*) y 4185 pares de bases (*Neisseria meningitidis*) (Klenk *et al*, 1994). Uno de sus únicos problemas para ser utilizado como gen blanco en distintos estudios es que no existe una base de datos suficientemente amplia y sus secuencias deben de ser obtenidas directamente del GenBank (Adekambi *et al*, 2009).

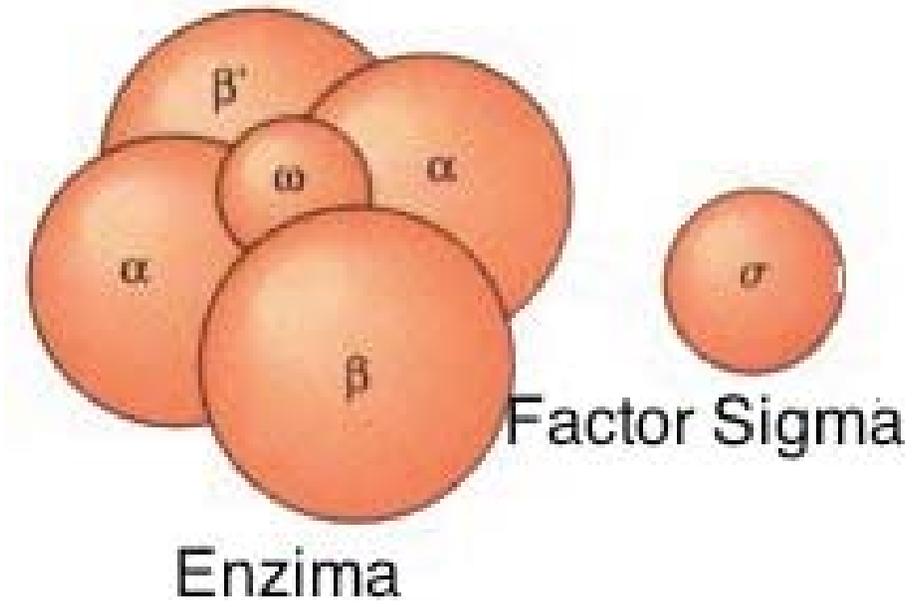


Figura 7. ARN polimerasa

## Antecedentes

En el grupo de trabajo se ha estudiado la composición y características fisicoquímicas del queso Cotija (Hernández- Briones, 2007), los cuales se presentan a continuación.

- *Análisis proximal del queso*

Tabla 1. Valores del análisis proximal al queso Cotija

Proteína	39%
Grasa	37%
Humedad	32 - 40%
Cenizas	8.7 - 11.2%
Carbohidratos	0.12 - 0.24%

- *Características fisicoquímicas:*

• Tabla 2. Valores de las características fisicoquímicas del queso Cotija

aw	0.9 máximo
pH	4.8 a 5.2
Ácido láctico	0.2 - 0.32%
Cloruros	4.7 - 7.2%

Debido a que el queso Cotija se elabora con leche cruda, que no hay algún proceso térmico en su elaboración y a que es un producto madurado, se han realizado distintos estudios dentro del grupo de trabajo con el fin de conocer aspectos sobre la ecología microbiana del producto.

Hernández Mejía ( 2007) aisló bacterias proteolíticas con medio selectivo y después mediante la amplificación del gen blanco 16S, identificó a nivel de género a *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus* con identidades superiores a 97%.

Bravo Mendoza (2008) aisló bacterias ácido lácticas con medios selectivos y las cuantificó en el queso Cotija, encontrando como dominante al género *Enterococcus*. Pudo identificar 11 cepas de *Enterococcus faecium* y 3 de *Lactobacillus plantarum*.

García Saturnino (2011) identificó mediante secuenciación de la región ribosomal del 16S del ADN y tiras API a los siguientes microorganismos lipolíticos: *Staphylococcus psifermentans*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *Bacillus pumilus*, *Candida zeylanoides* y *Yarrowia lipolitica*.

Cortés Díaz (2009) pudo identificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, a nivel de género a distintos microorganismos presentes en el queso Cotija. Encontró al género *Lactobacillus* presente en el 100% de las muestras que

analizó, mientras que en el 30% detectó la presencia del género *Lactococcus*. Adicionalmente logró identificar a *Enterococcus faecium* en el 70% de las muestras.

Un estudio más profundo de las comunidades microbianas requiere del uso de otras técnicas. Una de estas herramientas usada para la identificación de microorganismos que ha proporcionado buenos resultados ha sido la amplificación de fragmentos del gen ribosomal 16S seguida de la electroforesis en gel por gradiente desnaturizante. Mediante esta técnica, usando cebadores universales para bacterias, se puede llegar a realizar un análisis global de la diversidad dinámica y dominancia de la población bacteriana en alguna muestra o ambiente. Así, Zúñiga (2009) identificó microorganismos pertenecientes al grupo de bacterias lácticas que se han encontrado en otros productos lácteos fermentados tradicionales. La consiguiente secuenciación de las bandas obtenidas a partir de la técnica PCR- DGGE usando cebadores para 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 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. Posteriormente, con la misma metodología, Gómez Castelo (2010) por medio de cebadores específicos para la familia *Firmicutes*-BAL halófilas (región V3 hasta región V8 del gen 16S del ADNr), logra identificar en las muestras de queso Cotija las siguientes bacterias: *Enterococcus asini*, *E. termitis*, *Lactobacillus sakei* y *Vagococcus carniphilus*, De la misma manera García- Saturnino y Quirasco (2010) presentan un estudio del Queso Cotija utilizando DGGE y la secuenciación de las bandas obtenidas. Mediante dichas herramientas llegan a identificar *Staphylococcus spp.*, *Lactococcus lactis*, *Paenibacillus polymyxa* y *Marinilactibacillus sp* (García Saturnino *et al*, 2010).

Sin embargo, en los 3 estudios donde se desarrolla la técnica de DGGE, se presenta el problema de microheterogeneidad, el cual es la presencia de amplicones a diferentes porcentajes de desnaturizante, con la misma identidad. Esto parece ser debido a que el gen 16S del ADNr presenta diversas copias, mutaciones que se creen aparecen por una adaptación de los microorganismos al ambiente donde se encuentran y su consiguiente adaptación (García Saturnino *et al*, 2010). En la Figura número 8 se presenta un gel de DGGE obtenido por García- Saturnino y Quirasco donde, una misma especie aislada presenta diversas bandas en el mismo carril, con la misma identidad.

Por lo anterior podemos observar que la técnica PCR/DGGE con blanco de amplificación en la región V3 del ADNr, presenta el problema de heterogeneidad (Nielsen, 1998), por lo que la elección de la secuencia de amplificación objetivo es crucial para obtener una confiable identificación de géneros y especies.

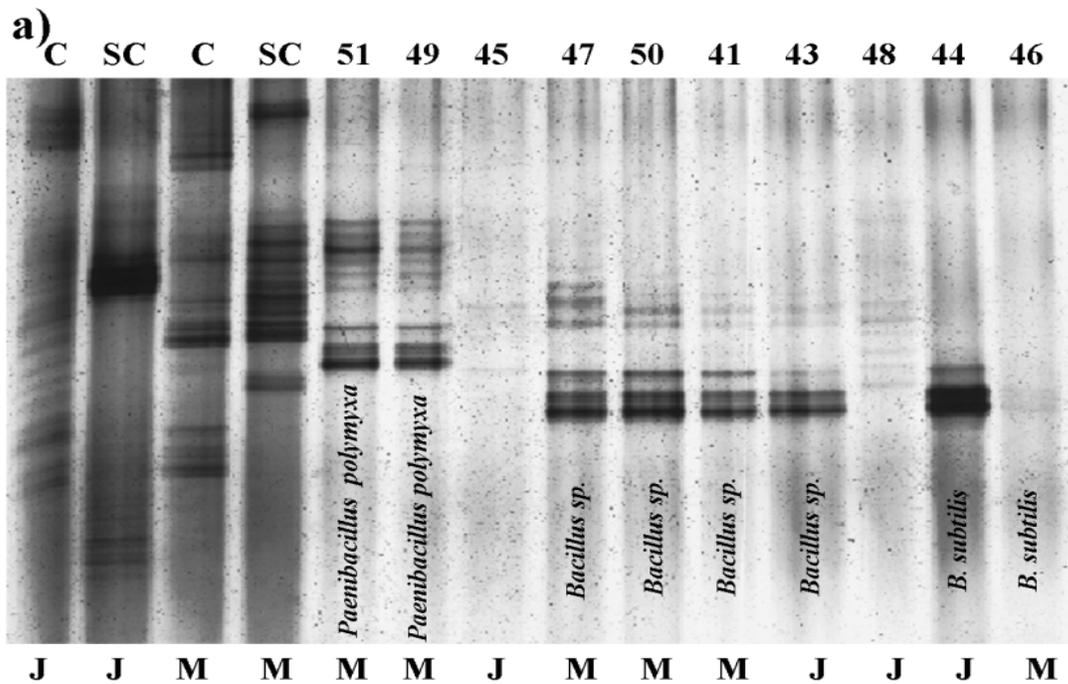


Figura 8. DGGE García Saturnino- Quirasco (2010). Gradiente del gel (30-70%) Muestras provenientes de Jalisco (J) y Michoacán (M). Carriles: C, cuajada; SC, cuajada salada; números, colonias lipolíticas aisladas de sal marina.

Además de la identificación de diferentes microorganismos con esta técnica, los estudios llegaron a la conclusión que no solamente la leche cruda proporciona la diversidad microbiana presente en queso Cotija, sino que el proceso de elaboración es de suma importancia, como también puede llegar a ser la sal utilizada en el punto de salación, el cuajo utilizado, el tiempo de maduración de cada queso así como variaciones geográficas donde se manufactura el producto de interés.

Con base en estos antecedentes se plantea realizar una caracterización proximal, fisicoquímica y molecular de muestras de Queso Cotija de 2 diferentes regiones del país, tratando de solventar el problema de microheterogeneidad, a través de la utilización del gen *rpoB* como blanco a amplificar.

## **Justificación**

Debido a los estudios previos sobre el queso Cotija elaborado en la Sierra de Jalmich, así como su probable reconocimiento como producto con denominación de origen, surge la duda si es que acaso otro queso similar producido en otra región de México tendría las mismas características que el primero. Es por esto que se plantea hacer una comparación a fondo con muestras provenientes tanto de Jalmich como de otra región, en este caso Chiapas, estado en el cual también se produce queso Cotija. Por lo anterior se realizará una caracterización proximal, fisicoquímica y molecular de muestras de Queso Cotija de las regiones del país anteriormente mencionadas. Se utilizarán dos genes blanco de amplificación: ADN<sub>r</sub> 16S (región V3) y gen *rpoB* para evitar el problema del multibandeo, originado por la microheterogeneidad del gen ribosomal 16S.

## **Hipótesis**

Debido a que los procesos de manufactura del queso Cotija son diferentes entre los productores de la Sierra de Jalmich y los de Chiapas, aunado a las diferencias geográficas entre ambas regiones, los quesos elaborados en dichas zonas tendrán diferencias marcadas en cuanto a sus características fisicoquímicas, de componentes macromoleculares y en cuanto a composición microbiana.

## **Objetivo General**

Comparar en términos de composición química y microbiológica al queso Cotija elaborado en la región de origen, que es en la Sierra de Jalmich (Michoacán y Jalisco), con el queso Cotija elaborado en Chiapas, particularmente en la ciudad de Tonalá y sus alrededores.

## **Objetivos Particulares**

Comparar a la comunidad microbiana presente en el queso tipo Cotija elaborado en la región de Jalmich con el elaborado en Tonalá, Chiapas a través de DGGE , amplificando y secuenciando:

- La región V3 del gen ribosomal 16S
- El gen *rpoB*

Determinar diversidad y dominancia relativa de las poblaciones.

Comparar la proporción de macrocomponentes de los quesos de ambas regiones.

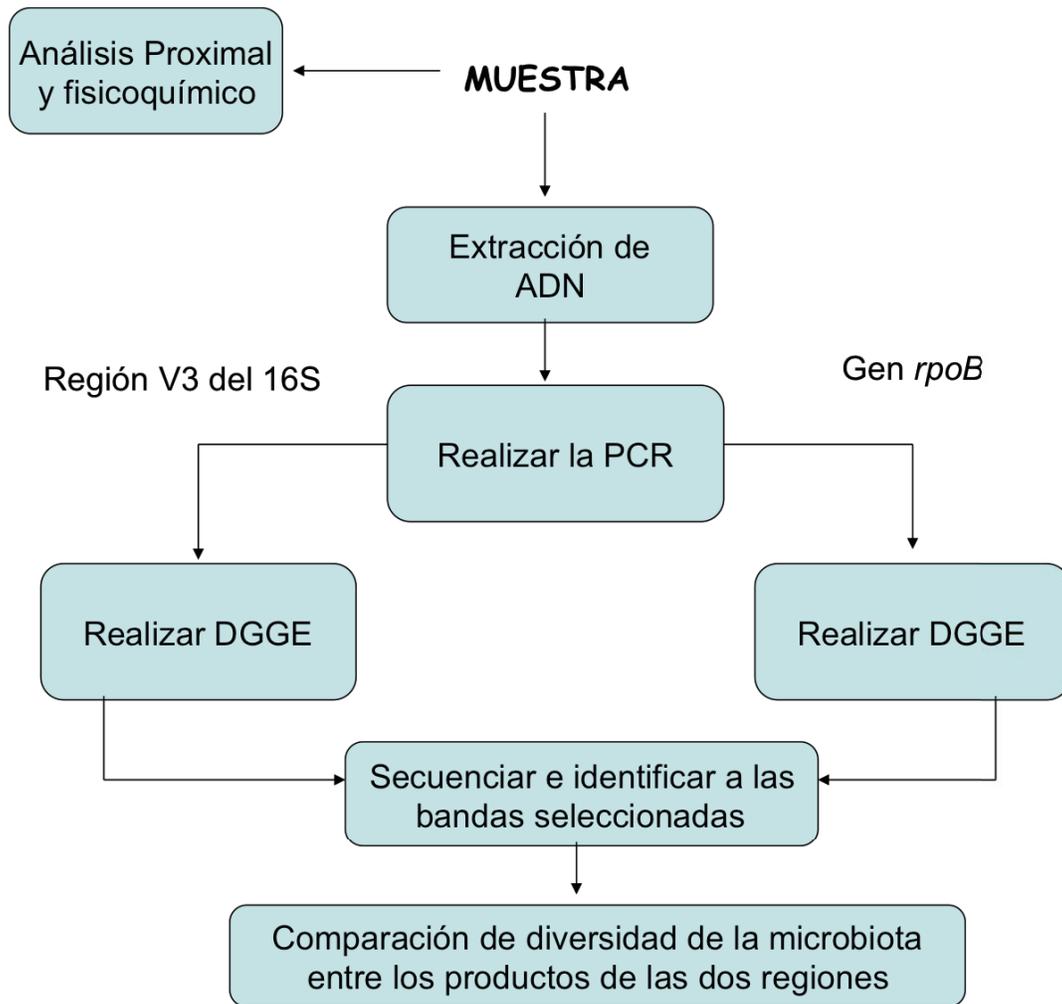
Comparar los parámetros fisicoquímicos de las distintas muestras de queso.

## Estrategia Experimental

Obtención de las muestras de Chiapas directamente con los productores, además de recabar información concerniente a la elaboración.

Caracterizar estas muestras junto con las muestras de Jalisco, fisicoquímicamente, mediante análisis proximal y caracterización molecular.

### Diagrama experimental



## Muestras

Todas las muestras eran de 2 kg

Tabla 3. Productores de las muestras analizadas

No. muestra	Origen	Ubicación Geográfica
1	Rancho Plaza de Chávez	Quitupán, Jalisco
2	Rancho la Jabalina	Sta. María del Oro, Jalisco
3	Rancho La Tortuga	Sta. María del Oro, Jalisco
4	Rancho La Mesa del Aguacate	Sta. María del Oro, Jalisco
5	Rancho la Mesa del Guayabo	Quitupán, Jalisco
6	Rancho la Piedra Amarilla	Jilotlan, Jalisco
7	Rancho San Nicolás	Cotija, Michoacán
8	Rancho La Tortuga	Sta. María del Oro, Jalisco
9	Rancho El Caracol	Sta. María del Oro, Jalisco
10	Rancho El Lorenzo	Quitupán, Jalisco
11	Rancho Las Cabras	Mpio. Quitupán, Jalisco
12	Rancho Buena vista	Quitupán, Jalisco
C	Lácteos La Ordeña	Tonalá Chiapas
D	Lácteos Saucito	Tonalá, Chiapas
E	Lácteos Pilar Cotija	Pijijiapan, Chiapas
F	Quesería Pijijiapan	Pijijiapan, Chiapas
G	Quesos Tonalá	Tonalá Chiapas
H	Lácteos El Che	Tonalá Chiapas

### **Análisis fisicoquímico**

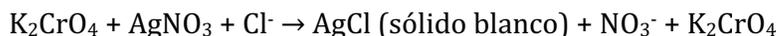
*Determinación de actividad acuosa* (Hernández Briones, 2007)

Se pesaron 5 gramos de la muestra a valorar y se homogenizaron. Esta cantidad se puso sobre la placa del equipo aWQuick (Rototronic Instrument Corp) de manera uniforme. Una vez que la lectura fue estable (lo cual es indicado por el mismo equipo), se registró inmediatamente el valor dado.

*Determinación de cloruros* (Horwitz, 1975)

Se pesaron 10 gramos de la muestra a valorar, a los cuales se les agregó 40 mL de agua destilada a 50°C en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 200 rpm. Posteriormente se decantó, y el sólido se filtró en gasa y lavado con agua destilada hasta llegar a obtener un volumen de 100 mL aproximadamente. Una vez en este punto, el pH del líquido obtenido se ajustó a 7 con sosa diluida y después se aforó con agua destilada en un matraz de 100 mL. De ese matraz se tomó una alícuota de 20 mL, que se trasvasó a un matraz de 50 mL al que se le adicionó 1 mL de una solución al 10% de K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>.

Esta mezcla se tituló con AgNO<sub>3</sub> 0.1 N hasta observar la aparición de una coloración rojo ladrillo estable por 20 segundos. Para obtener la cantidad de cloruros en la muestra también se debe titular un blanco de agua pH 7.





$$\% \text{NaCl} = (\text{mL AgNO}_3 \text{ mtra} - \text{mL AgNO}_3 \text{ blco}) \times \text{N AgNO}_3 \times 5.85 \text{g mtra} \times \text{alícuota} (\text{mL}) / \text{Aforo} (\text{mL})$$

#### *Determinación de pH (NMX-F-099-1970)*

Se pesaron 9 gramos de la muestra a valorar y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, al que se le agregaron 10 mL de agua destilada que previamente se ajustó a pH 7. La mezcla se sometió a incubación a 30°C a 200 rpm por 15 minutos. El contenido del matraz se filtró en gasa, hasta la obtención de una solución sin grumos y se midió directamente el pH con un electrodo de plata/calomel.

#### *Determinación de acidez (NMX-F-206-1986)*

Del filtrado de la determinación anterior, se tomó una alícuota de 25 mL con una pipeta volumétrica y se trasvasó a un matraz Erlenmeyer de 250 mL al que se le adicionaron 0.5 mL de fenolftaleína al 1% de solución alcohólica.

Esta mezcla se tituló con hidróxido de sodio al 0.1 N con agitación continua, hasta observar el viraje a coloración rosa de la solución y que se mantuviera por 30 segundos (9).

$$\% \text{Ácido láctico} = \frac{(\text{mL NaOH} \times \text{N NaOH} \times 0.09 \text{ meq}) \times 100}{\text{g muestra}}$$

### ***Análisis Proximal***

La FAO lo define como los análisis que se aplican en primer lugar a los materiales que se usarán para formular una dieta como fuente de proteína o de energía y a los alimentos terminados, como un control para verificar que cumplan con las especificaciones o requerimientos establecidos durante la formulación. Estos análisis indican el contenido de humedad, proteína cruda (nitrógeno total), lípidos crudos, ceniza y extracto libre de nitrógeno en la muestra

El análisis proximal se solicitó a la Facultad de Medicina y Veterinaria Zootecnista (FMVZ) en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la UNAM, salvo el análisis de carbohidratos, que se llevó a cabo en el laboratorio 312 del edificio E de la Facultad de Química de la UNAM. Las metodologías utilizadas en FMVZ se detallan en el anexo.

*Humedad- Método por secado en estufa de vacío (Nielsen, 2003)*

*Cenizas- Método cenizas totales (calcinación) (Kirk et al, 1996)*

*Proteína- Método micro Kjeldahl. (Norma NMX-F-098-1976)*

*Lípidos- Método Soxhlet (Nielsen, 2003)*

*Carbohidratos (Método Fenol- Sulfúrico descrito por Dubois, 1956)*

Se diluyeron 0.2g de queso en agua hasta encontrarse en el intervalo de sensibilidad del método (10-100 µg/mL). Posteriormente se colocó 1 mL de la solución acuosa en un tubo de ensayo y se añadieron 0.6mL de fenol al 5%. Se

mezcló y se adicionaron 3.6 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Se mezcló y dejó reposar por 30 minutos, terminados los cuales se le midió la absorbancia a la mezcla a 480nm. El porcentaje de carbohidratos totales se calculó a partir de una curva patrón preparada con una solución de glucosa.

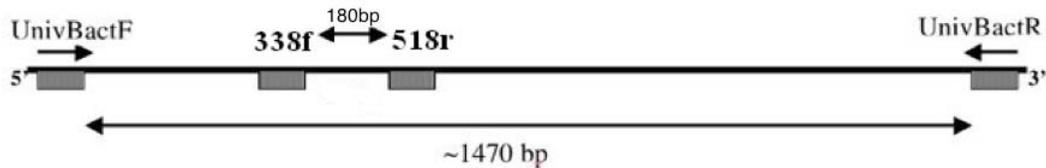
### **Análisis de la microbiota**

A continuación se muestran las regiones de los genes blancos que se amplificaron.

Amplificación de la región 16S de ADNr

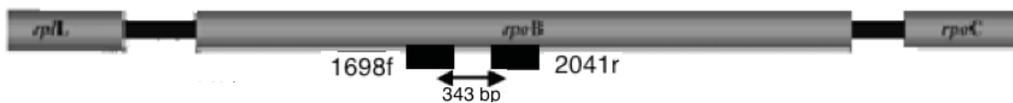
- Cebadores Universales (Zúñiga 2009) (tamaño de amplicón esperado 180pb)

338F            ACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
B518R        ATTACCGCGGCTGCTGG



- Cebadores de *rpoB* (Dahllof *et al.* 2000) (tamaño de amplicón esperado 343 pb)

rpoB1698f    AACATCGGTTTGATCAAC  
rpoB2041r    CGTTGCATGTTGGTACCCAT



En los dos casos se añadió una grapa de guanina y citosina de 40 bases al extremo 5' de los cebadores delanteros (CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGCCCC).

### **Recuperación del paquete celular a partir del queso**

Las muestras de queso Cotija se descongelaron y pusieron en refrigeración a 4°C por no más de 18 h previo a su utilización según lo establecido en la norma NOM-110-SSA1-1994. Posteriormente se recuperó el paquete celular. La muestra de queso fue tratada con citrato de sodio y neutrasas, y homogeneizada con ayuda de un Stomacher. Posteriormente se incubó, para después centrifugarse y lograr así separar las células de los organismos de las demás fracciones. Las células se centrifugaron y se lavaron con solución salina. Por último los paquetes celulares se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Este procedimiento se realizó por duplicado. El procedimiento detallado se encuentra en el anexo A.

### Extracción de ADN

Se empleó un kit comercial de extracción y purificación de ADN (Fast ID®), basado en la ruptura celular con detergentes iónicos, la purificación se basa en la unión específica del ADN a una membrana de sílica. El paquete celular obtenido del queso directamente en forma de pellet (con el procedimiento arriba mencionado), se trató con proteinasa K (10 mg/mL), solución de lisis (1 mL) y lisozima (~5-10 mg). Se incubó a 65 °C/ 600 rpm/ 30 minutos (Thermomixer, Eppendorf). Se añadió cloroformo en relación 1:1, se agitó vigorosamente y posteriormente se centrifugó a 10000 rpm/ 5 min en una microcentrífuga (eppendorf). Se separó la fase acuosa superior transfiriéndola a un tubo eppendorf de 2 mL, se añadió amortiguador de unión en relación 1:1 y se transfirió a una columna que contiene la membrana de sílica. Se lavó la columna para eliminar sustancias que pudieran inhibir la reacción de PCR y por último se eluyó el ADN con amortiguador TE 1X a 65 °C. El ADN obtenido se conservó a -20 °C hasta su uso. Los pasos específicos se muestran en el Anexo. B

### Análisis del ADN extraído

La concentración se obtuvo midiendo la absorbancia a 260 nm en el espectro Epoch Biotek (la relación de absorbancia 260/280 se utilizó como índice de pureza).

### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizaron los cebadores previamente mencionados para amplificar, tanto un fragmento de aproximadamente 180 pb de la región V3 del gen 16S del ADNr (cebadores 338F- B518R) (Invitrogen) como un fragmento de aproximadamente 343 pb del gen *rpoB* (cebadores rpoB1698f- rpoB2041r) de los microorganismos dentro de las muestras.

En la Tabla 2 se presentan las concentraciones y volúmenes requeridos de cada reactivo para la PCR.

**Tabla 2.** Lista de reactivos utilizados para la reacción de PCR.

Orden	Reactivo	Conc. inicial	Conc. final	Volumen (µL) 50 µL rx
2	Buffer Pfu	10X	1X	5
3	MgCl <sub>2</sub>	50 mM	5 mM	1
4	dNTP's	10 mM	0.2 mM	1
5	Cebador F	10 µM	0.2 µM	1
6	Cebador R	10 µM	0.2 µM	1
7	and	-----	≈100 ng	-----
8	Pfu	2.5 U/µL	1.25 U/reacción	0.5
1	Agua	-----	-----	cbp 50 µL

**Nota:** Todos los reactivos se mantuvieron en hielo hasta su uso.

La amplificación se realizó en el termociclador (AXYGEN MAXYGENE). En las Tablas 3 y 4 se muestran las condiciones de la PCR para la amplificación del fragmento deseado tanto del gen 16S del ADNr como del gen *rpoB*.

**Tabla 3.** Condiciones empleadas para la amplificación de los cebadores de la región V3 del 16S del ADNr. Tomadas de Zuñiga 2009

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	5 min
20	94	1 min
	65	1 min
	72	3 min
10	94	1 min
	55	1 min
	72	3 min
1	72	10 min

**Tabla 4.** Condiciones empleadas para la amplificación de los cebadores del gen *rpoB* Tomadas de Raintsou

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	5 min
10	95	1 min
	58	1 min
	72	1:30 min
20	94	1 min
	52	1 min
	72	1:30 min
1	72	7 min

#### *Análisis de los amplicones*

Con el fin de verificar la presencia, peso y pureza de los amplicones obtenidos se corrieron geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (2  $\mu$ L/10 mL de agarosa). La electroforesis se llevó a cabo a 90 V por 45 min, utilizando como marcador el Mass Ruler, Low Range Ladder de Fermentas; se visualizó en el transiluminador de UV ColePalmer. La concentración se obtuvo midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en el espectro Epoch (Biotek).

#### *Purificación de los amplicones*

Una vez verificada la presencia del amplicón mediante el gel de agarosa se procedió a realizar una purificación con ayuda del kit de Roche High Pure PCR Product Purification Kit. El kit está basado en que bajo las condiciones del amortiguador utilizado, todos los ácidos nucleicos se unen a la fibra de vidrio del filtro utilizado en las torres de purificación, mientras que otros contaminantes, como sales, proteínas, nucleótidos y aceites minerales, no se unen.

Los productos de PCR se llevaron a un volumen de 100  $\mu$ L con agua grado biología molecular. Posteriormente se añadió 500  $\mu$ L de amortiguador de unión, se mezcló

y traspasó a una columna de purificación. Esta columna se centrifugó a máxima velocidad por un minuto y el líquido se descartó. Se añadieron 500 µL de amortiguador de lavado y se centrifugó por un minuto y se descartó el líquido. Se añadieron a la columna 200 µL de amortiguador de lavado nuevamente y se volvió a centrifugar por un minuto. Se descartó de nuevo el líquido y el tubo de recolección y se acopló un tubo de 1.6 mL a la columna. Se añadieron 50 µL de buffer de elución (previamente calentado a 65°C) y se centrifugó obteniéndose en el líquido el ADN purificado.

*DGGE (Muyzer et al., 1993)*

Se empleó el equipo DCode™ Universal Mutation de BIORAD.

Primeramente se realizaron los geles perpendiculares para los dos diferentes grupos de amplicones. En ambos casos el procedimiento fue el mismo, el cual constó en depositar 100 µg de los productos de amplificación (en igual proporción de cada muestra) a lo largo de un único pozo en un gel de poliacrilamida (6% p/v para los amplicones de la región de *rpoB* y 10% p/v para los amplicones del gen *V3*) con un intervalo desnaturalizante de 20% a 70%. Los reactivos utilizados así como sus proporciones para crear el intervalo se detallan en los anexos AII-AIV. La electroforesis se corrió a 80 V por 6 horas a 60°C en amortiguador TAE 1X. Posteriormente el gel se tiñó usando el PageSilver Silver Staining Kit, (Fermentas). Una vez encontrados los intervalos específicos de concentración de agentes desnaturalizantes se procedió a realizar los geles paralelos para los dos diferentes grupos de amplicones. En este caso en cada pozo se cargó 5 µg de la muestra dada en el caso de las muestras de JalMich y 7 µg para las muestras de Chiapas, y las electroforesis se corrieron a 80 V durante 17 h a 60°C en amortiguador TAE 1X (40 mM Tris-HCl, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8); en ambos casos se cargaron 3 µg de muestra por carril. Los geles se tiñeron con plata. La preparación de las soluciones se describe en el Anexo A.

*Recuperación del ADN obtenido de las bandas seleccionadas*

Se seleccionaron bandas y se cortaron de los geles con ayuda de una navaja estéril. Éstas se resuspendieron en 100 µL de amortiguador de elución, el cual constaba de 10 mM de acetato de magnesio, 0.5M de acetato de amonio y 1 mM de EDTA(pH 8.0). El ADN se eluyó del gel después de incubar doce horas a 37 °C, seguido de una centrifugación de 10 minutos a 4 °C. El ADN se recuperó en forma de precipitado blanco. Una vez lavado el ADN con etanol al 70%, se llevó a un volumen de 25 µL con TE. El ADN recuperado se reamplificó con los respectivos cebadores, como se describió anteriormente para su posterior secuenciación.

*Purificación*

Los productos de PCR reamplificados se purificaron usando el High Pure PCR Product Purification kit (ROCHE Applied Science, IN, U.S.A.), y se resuspendieron en agua grado biología molecular. La pureza de los productos de PCR se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 2% (p/v).

### *Secuenciación*

Las muestras se secuenciaron por MACROGEN-Korea.

### *Análisis de secuencias*

Los alineamientos entre las secuencias directa y reversa se efectuaron con ayuda del programa Multialin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) y se realizó la comparación de las secuencias con el banco de datos de NCBI (National Center of Biotechnology Information), mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Ma *et al.*, 2002) para nucleótidos.

## Resultados y discusión

Las muestras provenientes de Jalmich se encontraban ya en el laboratorio ya que fueron recolectadas por Quirasco Baruch y García Saturnino en el año 2009.

Tonalá es una ciudad en el estado de Chiapas se ubica entre los 10 y 2400 metros sobre el nivel del mar. Su temperatura oscila entre los 26 y 30°C y su clima es semiseco. En junio del 2010 la visité para la recolección de muestras de distintos productores, además de recabar información sobre el proceso de elaboración, la que se muestra a continuación

**1- Recepción de materia prima.** Leche bronca ordeñada del mismo día que se produce el queso. Proviene de distintos ranchos, de ganado criollo y cebu principalmente.

**2- Colado en manta.**

**3- Adición de leche en polvo entera y descremada.**

**4- Adición del cuajo.** Se utiliza cuajo de origen microbiano *Rhizomucor miehei*, marca Fromasse.

**5- Raya en lira vertical.**

**6- Desuerado.**

**7- Salado.** La sal se añade directamente a la cuajada a mano. La sal generalmente es sal de grano comercial (La Fina).

**8- Moldeado y prensado.** Se realiza durante 12 horas en moldes circulares de aproximadamente 26 cm de diámetro por 16.5 cm de alto con pesas que van de los 30 a los 45 kg.

**9- Madurado.** En yute o faja de 48 a 72 horas.

El productor a gran escala:

- Recibe leche de varios ranchos, donde en algunos tienen vacas Holstein.

En la Tabla 5 se muestran las diferencias más significativas entre los dos procesos de producción, tanto del queso producido en Jalmich y en Chiapas

Tabla 5. Diferencias en los procesos de las 2 regiones

Proceso \ Región	Jalmich	Tonalá, Chiapas
Tipo de leche	Bronca	Bronca, descremada y en polvo
Tiempo de maduración	Mínimo 3 meses	24- 72 horas
Ordeña	Manual	Mecánica
Cuajo	Origen animal	Origen <i>Rhizomucor miehei</i>
Temporalidad de la producción	Julio- Octubre	Todo el año

### Determinación de parámetros fisicoquímicos

Los análisis fisicoquímicos se realizaron por triplicado para cada aspecto y muestra. A continuación se presentan los promedios de las réplicas y las desviaciones estándar de los quesos de la región de Jalmich (muestras 1-12) y de Chiapas (muestras C-H). Para determinar si había diferencias significativas entre las muestras se utilizó el método estadístico de Fisher. Las Figuras 10 a 13 contienen los resultados de las determinaciones de pH, porcentaje de acidez, porcentaje de cloruros y actividad acuosa, respectivamente. Los valores crudos se encuentran en los anexos AX-AXIII.

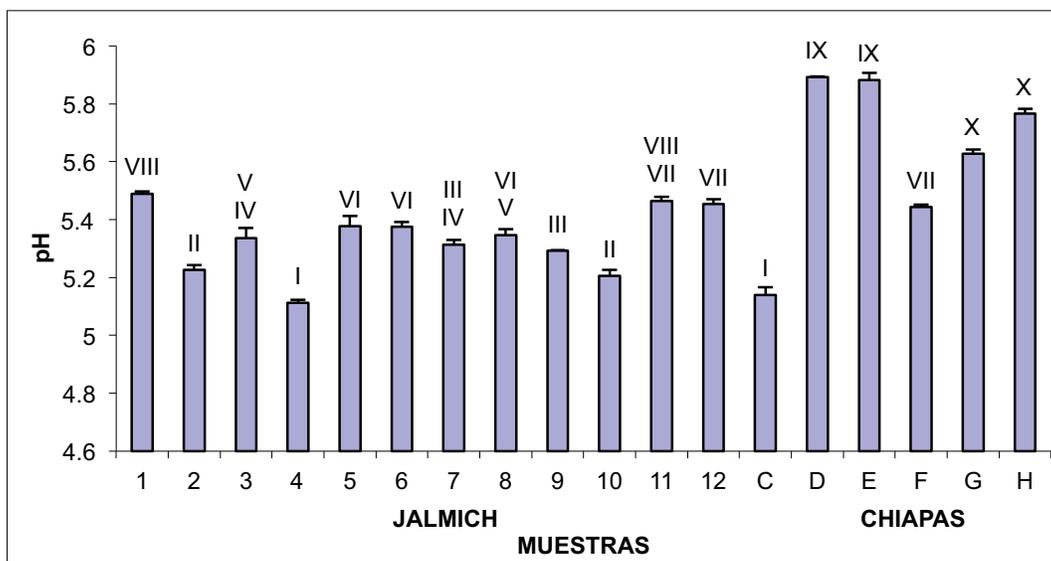


Figura 10. Valores de pH. Números, muestras Jalmich. Letras, muestras Chiapas. Cada número romano muestra una diferencia estadística con un  $\alpha = 0.05$ . NMX-F-099-1970

Parece haber una tendencia que indica, ya que las muestras de Chiapas poseen valores más altos de pH que aquéllos mostrados por los quesos de la Sierra de Jalmich, comparando los valores promedio de los quesos de cada zona productora, que fueron de 5.32 para las muestras de Jalmich y 5.62 para las muestras de Chiapas. Una explicación a dicha tendencia podría estar relacionada con el tiempo de maduración de cada una de las muestras. La fase de maduración es donde principalmente las bacterias ácido lácticas transforman los carbohidratos en ácido láctico por medio de una fermentación. Así pues, a un mayor tiempo de maduración mayor producción de ácido láctico, lo que origina un descenso de pH. Como ya se explicó en la sección anterior el queso producido en Jalisco y Michoacán conlleva una maduración de al menos 3 meses, mientras que las muestras de Chiapas sólo se someten a una maduración aproximada de 3 días.

También se debe remarcar que no sólo las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico, también otros microorganismos como algunos *Bacillus* y especies como *Streptococcus infantarius* producen dicho ácido al fermentar la lactosa. Por otra parte, además de ácido láctico, otras sustancias llegan a influir en el descenso del pH (Freitas *et al.* 1999), entre los que se encuentran algunos ácidos orgánicos (fórmico, cítrico, acético y succínico), así como elementos como magnesio y calcio.

Se observan 10 diferentes grupos estadísticamente significativos sin haber una clara diferenciación entre las dos distintas zonas.

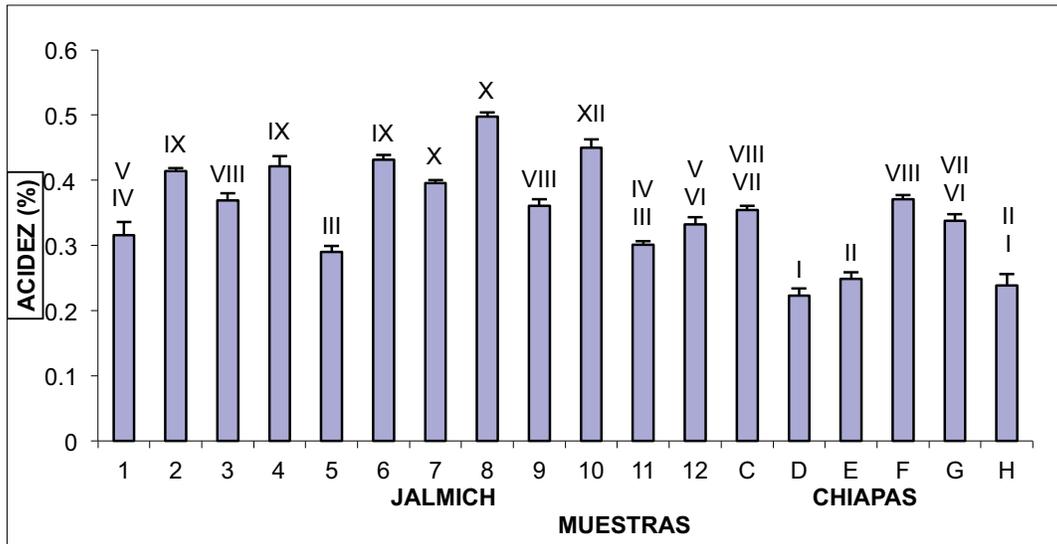


Figura 11. Valores de porcentaje de acidez (p/v). Números, muestras Jalmich. Letras, muestras Chiapas. Cada número romano muestra una diferencia estadística con un  $\alpha = 0.05$ . NMX-F-206-1986

Tal y como ocurre con el pH, en lo que se refiere a la acidez se observa una tendencia de los quesos de Jalmich (promedio de 0.38%) a ser más ácidos que aquellos producidos en Chiapas (promedio de 0.29%). Es decir un lapso mayor de maduración en la manufacturación del queso origina un mayor porcentaje de acidez en la muestra, en comparación con otra muestra que tuviera un menor tiempo de maduración.

En el caso del porcentaje de acidez se observan 10 diferentes grupos estadísticamente significativos, sin haber una clara diferenciación entre las dos distintas zonas, aunque se presentan 2 diferentes grupos (I,II) que sólo se observan en la zona de Chiapas.

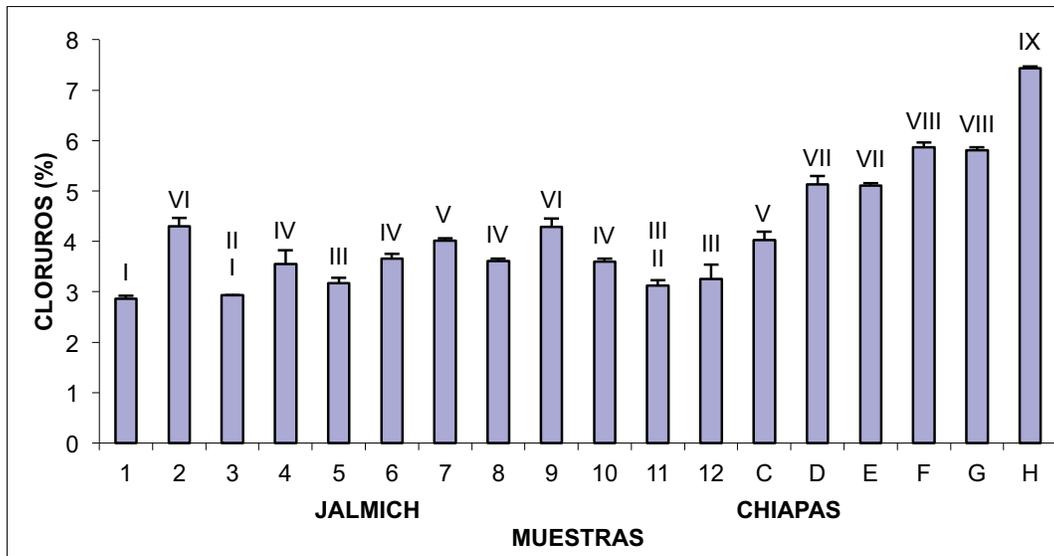


Figura 12. Valores de porcentaje de cloruros (p/v). Números, muestras Jalmich. Letras, muestras Chiapas. Cada número romano muestra una diferencia estadística con un  $\alpha = 0.05$ . Horwitz, 1975.

Las muestras de Chiapas (promedio 5.56%) presentan un mayor porcentaje de cloruros que el mostrado por los quesos de la Sierra de Jalmich (promedio de 3.52%).

Esto es debido al proceso de manufacturación donde probablemente los productores de Chiapas agreguen más sal que los productores de Jalmich. Aunque cabe recalcar que ningún queso sobrepasa el 7.2% reportado como característico en el queso Cotija. (Hernández 2007).

En el caso del porcentaje de cloruros se observan 9 diferentes grupos estadísticamente significativos. En este caso únicamente la muestra C de Chiapas se encuentra en un grupo donde también se incluyen muestras de la Sierra de Jalmich (VII), mientras que las otras 5 muestras se encuentran en grupos distintos a las muestras procedentes de Michoacán y Jalisco.

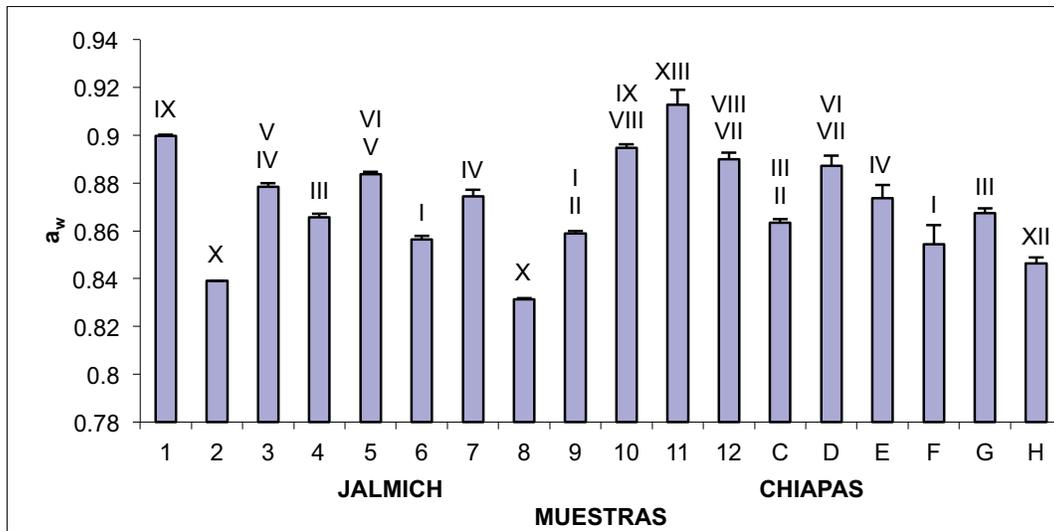


Figura 13. Valores de  $a_w$ . Números, muestras Jalmich. Letras, muestras Chiapas. Cada número romano muestra una diferencia estadística con un  $\alpha = 0.05$ .  $a_w$  quick

En cuanto a la actividad acuosa ( $a_w$ ) no se observa ninguna tendencia marcada que pudiera diferenciar a las muestras de Jalmich frente a las muestras de Chiapas. En el caso de  $a_w$  se observan 13 diferentes grupos estadísticamente significativos sin haber una clara diferenciación entre las dos distintas zonas.

Se hubiera esperado una menor actividad acuosa en aquellas muestras que presentaran un alto porcentaje de cloruros, pero no es así. Hay que hacer notar que el contenido de sal en una muestra no es el único parámetro que pudiera afectar el valor de  $a_w$ . Al ser un queso madurado otros compuestos como ácidos, aminoácidos, péptidos y calcio contribuyen al valor de la actividad acuosa. Además un factor muy importante y que no ha sido determinado es la humedad, que está totalmente relacionado con la actividad acuosa.

Se puede observar que en ambas zonas hay una gran variabilidad en todos los parámetros, esto puede ser debido a los diferentes procesos de manufactura empleados en cada zona (maduración, prácticas sanitarias, sal utilizada, etc), aunado a la diferencias propias de la geografía de cada región.

Con los valores obtenidos de los análisis fisicoquímicos se realizó un estudio estadístico, el cual se hizo con el programa MathStat para determinar si las diferencias entre las muestras de manera estadística. Primero se realiza una ANOVA por parámetro fisicoquímico y mediante comparación múltiple de medias se estableció cuales muestras eran significativamente diferentes. Este estudio se realiza mediante el método de la menor diferencia significativa de Fisher (Fisher's LSD) al 95% de confianza. Estas diferencias se presentan en cada gráfica con números romanos (mismos números romanos representan grupos homogéneos).

Al comparar los pares significativamente iguales entre los parámetros fisicoquímicos no parece haber ninguna tendencia, pero con todos los valores se procedió a la construcción de un dendrograma por el método de Ward, el cual se basa en una jerarquización con la menor pérdida de información.

En la figura 14 se presenta el dendrograma obtenido.

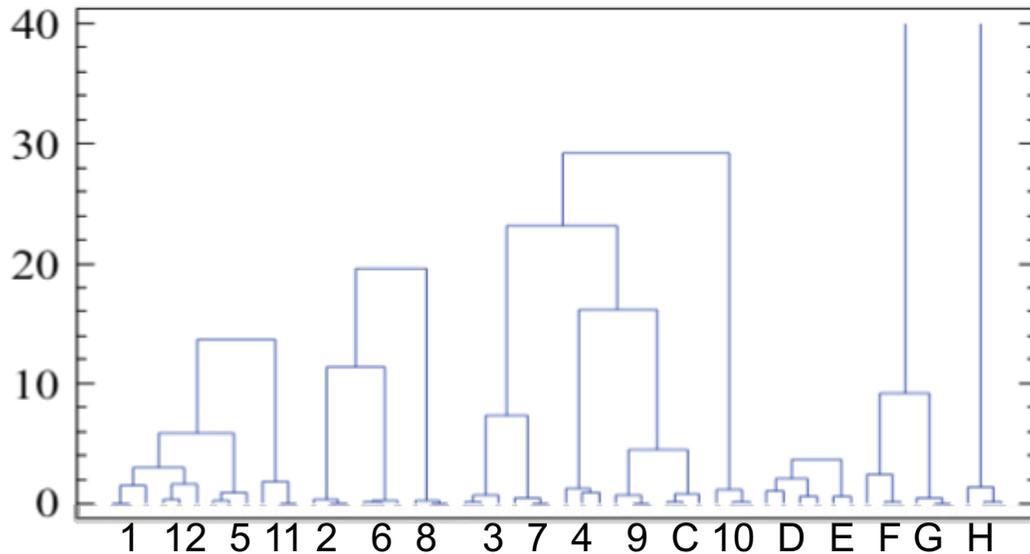


Figura 14. Dendrograma con los valores fisicoquímicos. Números, muestras Jalmich. Letras, muestras Chiapas

En el dendrograma se pueden observar diferentes grupos, pero lo significativo de la construcción es que casi todas las muestras provenientes de Chiapas se ubican juntas en grupos, separadas de las muestras provenientes de Jalmich. La única muestra de Chiapas que no entra dentro de lo previamente dicho es la muestra C.

Este resultado permite afirmar que en cuanto a los parámetros fisicoquímicos parece haber una diferenciación entre las muestras de Chiapas y las de Jalmich. A pesar de que no existe una tendencia de agrupación por zonas al analizar estadísticamente los parámetros fisicoquímicos aislados, sí se puede diferenciar el producto de cada zona al hacer un análisis estadístico que compare todos los parámetros.

### ***Determinación de Macrocomponentes***

A continuación se presentan los resultados de los análisis proximales, realizados por el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Las muestras con número del 1 al 12 provienen de la región de Jalmich, mientras que las muestras que están representadas con letras de la C a la H provienen de Chiapas. Las Figuras 15 a 19 contienen los promedios de las determinaciones de porcentaje de humedad, porcentaje de proteína, porcentaje de extracto etéreo, porcentaje de cenizas y porcentaje de extracto libre de nitrógeno, respectivamente. Se utilizó el método de Fisher para distinguir grupos estadísticamente diferentes (Los conceptos estadísticos se encuentran en el anexo 6). Los valores de los promedios y desviaciones estándar se encuentran en el anexo AXIV.

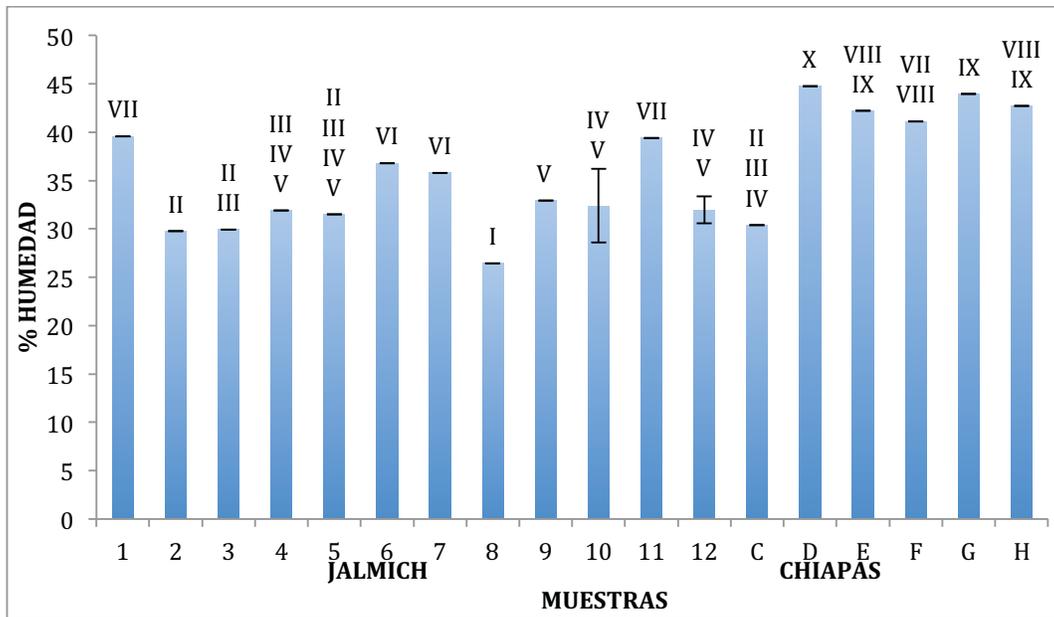


Figura 15. Valores de porcentaje de humedad. Números, muestras Jalmich. Letras, muestras Chiapas. Estufa de vacío.

En la humedad parece haber una tendencia a que las muestras de Chiapas poseen valores más altos que aquéllos mostrados por los quesos de la Sierra de Jalmich. Los promedios son 33.2% para las muestras de Jalmich y 40.85% para las muestras de Chiapas. Una explicación a dicha tendencia podría estar relacionada con el tiempo de maduración de cada una de las muestras. Las muestras de Jalmich tienen un proceso de maduración de 3 meses mínimo a temperatura ambiente y esta maduración no sucede en un área con temperatura controlada, por lo que con el paso del tiempo habría pérdidas importantes de humedad en el queso. Por el contrario en el queso proveniente de Chiapas, la maduración se da a temperatura controlada (4°C) y por espacio solamente de 3 días. Además hay que poner atención en cuanto a las zonas y los climas donde se producen los quesos, siendo Chiapas un lugar más húmedo que la zona de la Sierra de Jalmich.

El proceso de elaboración también puede ser un factor importante, ya que diferencias en el cortado, el prensado o tiempo de desuerado podrían arrojar diferencias significativas en los quesos (Hernández Briones, 2007). Esto puede darse hasta en quesos de la misma región ya que cada productor usa diferentes métodos para la elaboración. Se observan 10 diferentes grupos estadísticamente significativos y hay una clara diferenciación entre las dos distintas zonas, siendo que el grupo de Chiapas (exceptuando a C) contiene grupos estadísticamente diferentes y exclusivamente.

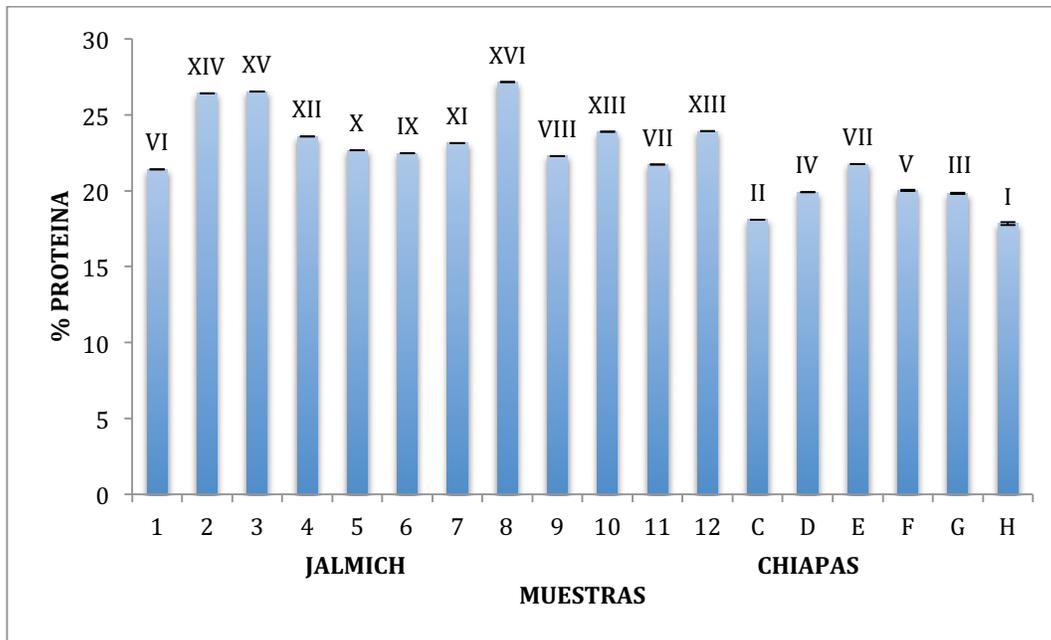


Figura 16. Valores de porcentaje de proteína. Números, muestras Jalmich. Letras, muestras Chiapas. NMX-F-098-1976

En el caso del contenido de proteína en términos porcentuales, los quesos provenientes de Chiapas tienen un promedio menor en porcentaje de proteína en comparación con las provenientes de la zona de Jalmich. Los promedios para las dos zonas son 23.76% para la zona de Jalmich, mientras que para la zona de Chiapas es de 19.57%. El contenido de proteína está determinado básicamente por la composición de la leche utilizada, base en la raza del ganado utilizado y la alimentación al que es expuesto (Fox *et al*, 2010). También se debe de tomar en cuenta en este punto el proceso de desuerado como determinante del contenido proteínico del producto final. La cantidad de proteína puede depender en gran parte de la calidad de este paso (Hernández Briones, 2007).

Casi la mitad de los quesos de la región de Jalmich no cumplen con el contenido mínimo de proteína establecido en las reglas de uso (min. 25% en base húmeda). Para este parámetro se observan 16 diferentes grupos estadísticamente significativos, por lo que se podría decir que prácticamente todas las muestras son distintas.

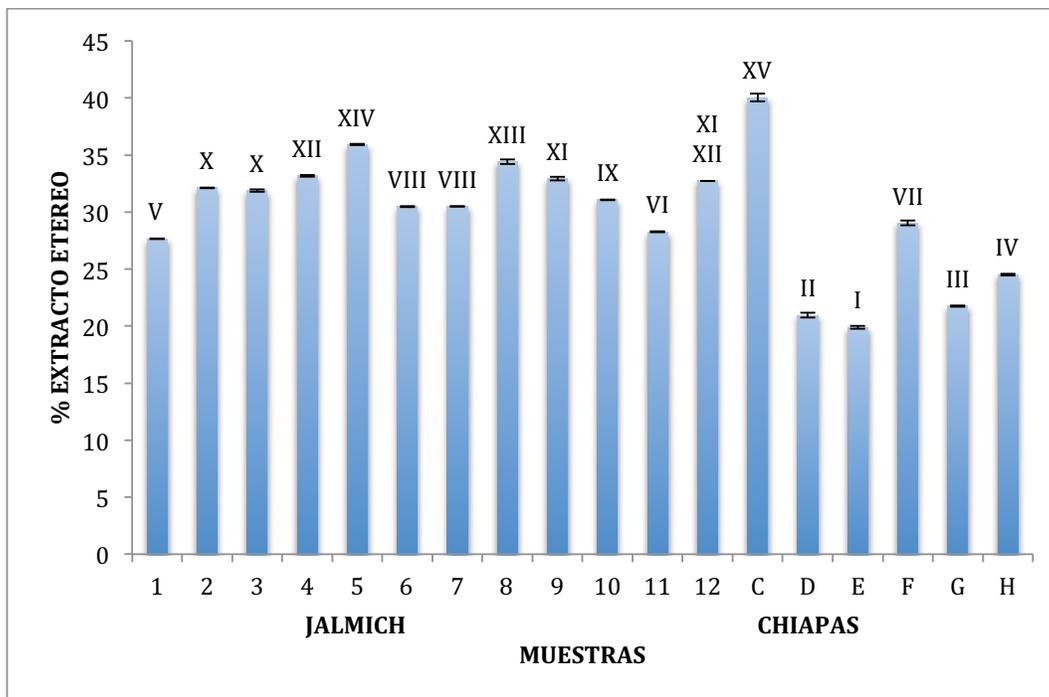


Figura 17. Valores de porcentaje de extracto etéreo. Números, muestras Jalmich. Letras, muestras Chiapas. Soxhlet

El extracto etéreo se considerará como el contenido de grasa total, y en este componente también hay una diferencia entre las muestras de Chiapas y las muestras de Jalmich. Los promedios de las dos zonas son 31.76% para la región de la sierra de Jalmich y 26.02% para la región de Chiapas. Un dato que salta a la vista es el obtenido para la muestra C proveniente de Chiapas, ya que es el valor más alto y no pareciera tener relación con las demás muestras provenientes de Chiapas.

Los valores de grasa están relacionados, tal como el valor de proteína, con el tipo de ganado utilizado para la manufactura del queso. Además del tipo de alimentación, edad del animal, periodo de lactancia y frecuencia de la ordeña. Otro factor muy importante a considerar es el tipo de leche que se utiliza para la elaboración de los quesos. En el caso de las muestras provenientes de Chiapas se utiliza leche descremada, lo que disminuye de manera considerable el contenido de grasa en el queso una vez elaborado. Este aspecto podría ser considerado como el principal en cuanto a las diferencias en los porcentajes de los grupos que se comparan. En este caso existen 15 grupos significativamente diferentes, donde igualmente parece que cada una de las muestras es diferente entre sí estadísticamente hablando.

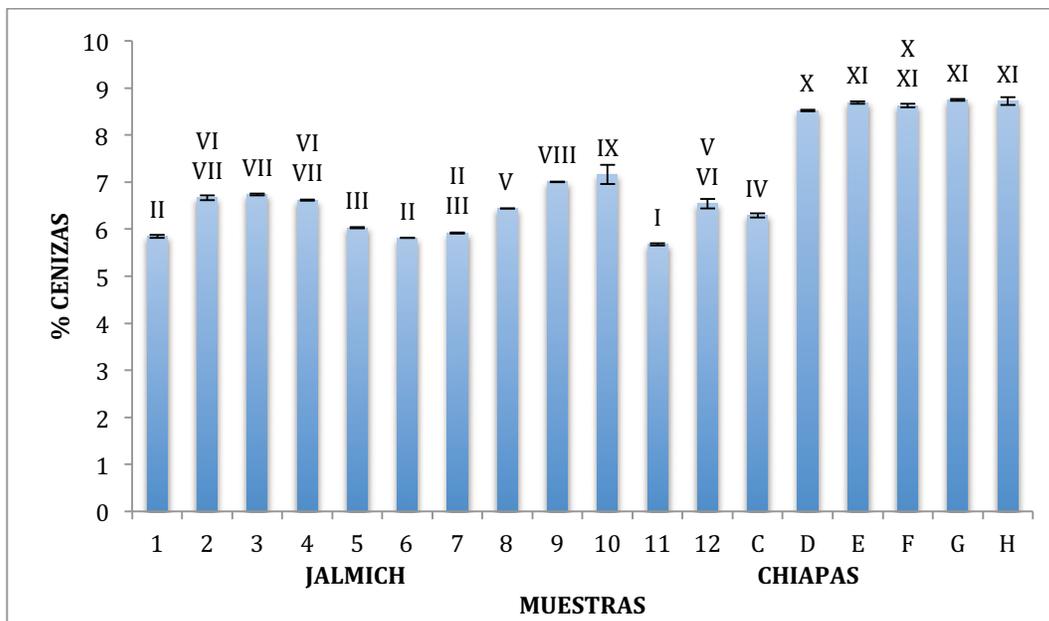


Figura 18. Valores de porcentaje de cenizas. Números, muestras Jalmich. Letras, muestras Chiapas. Calcinación

La cuantificación del porcentaje de cenizas en los alimentos no solamente considera el cloruro de sodio, sino también los minerales provenientes de la leche que se encuentran en forma coloidal asociados a las micelas de las caseínas, los cuales son los fosfatos, calcio (agregado en el proceso de Chiapas) y magnesio entre otros. Aunque debido a que el NaCl se añade en altas concentraciones, éste puede ser el componente principal en la cuantificación de las cenizas.

De igual forma, como en los otros aspectos estudiados en el análisis proximal, parece haber una tendencia que divide a las muestras provenientes de Chiapas y a las muestras provenientes de la sierra de Jalmich. Las muestras de Chiapas parecen tener un mayor contenido de cenizas que las de la región de Michoacán y Jalisco. Los promedios para las dos regiones son 6.37% (Jalmich) y 8.26% (Chiapas).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la cuantificación de cloruros en el análisis fisicoquímico, donde se observó un mayor porcentaje en las muestras de Chiapas, ya que en dicha zona se agrega una mayor cantidad de NaCl en el proceso de salado. Esto es debido a que la sal es utilizada como un aditivo para la conservación del producto. Se obtuvieron 11 grupos significativamente diferentes, y en este caso sí parece haber una clara tendencia que diferencia a los grupos de la zona de Chiapas de los de la zona de Jalmich.

Una vez obtenidos estos datos de composición proximal, se procedió a encontrar el valor para el extracto libre de nitrógeno por diferencia, el cual llega a ser considerado como la cuantificación de carbohidratos totales. En estudios previos dentro del grupo de trabajo se observó que la cuantificación de carbohidratos por diferencia presentaba una sobreestimación debido a que no se toman en cuenta

ácidos orgánicos y otros componentes volátiles. Además conlleva el error de cada uno de los diferentes análisis.

En quesos madurados la mayor parte de la lactosa se pierde durante el remanente y el desuerado, por lo que los valores de carbohidratos esperados deberían de ser menores al uno por ciento, pero en este caso oscilaron entre el 4 y el 7%. Por lo anterior se propuso la cuantificación de los carbohidratos por el método de fenol sulfúrico. Los valores promedio y las desviaciones estándar se presentan en la figura 19. Los valores crudos se encuentran en el anexo XV.

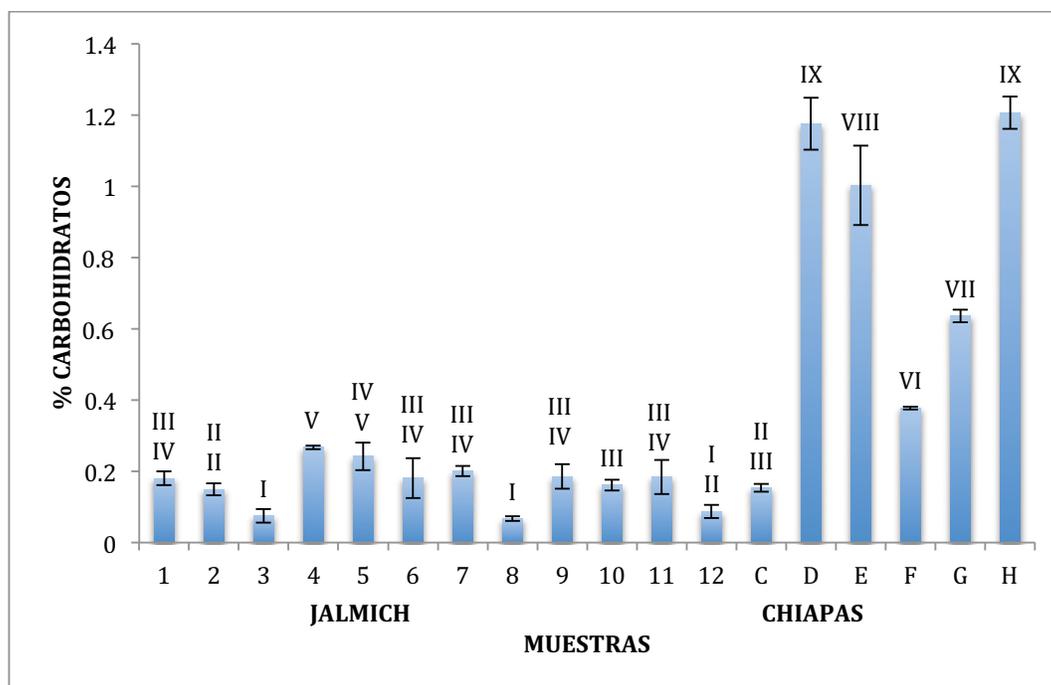


Figura 19. Valores de porcentaje de carbohidratos. Números, muestras Jalmich. Letras, muestras Chiapas. Fenol- sulfúrico, Dubois.

Los valores obtenidos mediante el método de fenol sulfúrico concuerdan con los valores esperados para carbohidratos en este tipo de queso, oscilando entre 0 y 1%.

De la misma manera que en los análisis de los otros componentes,, se observa una clara tendencia de diferenciación entre las muestras provenientes de la Sierra de Jalmich y las provenientes de Chiapas. Las muestras de la Sierra de Jalmich parecen tener un menor contenido de carbohidratos (valores que oscilan entre 0.3 y 0.05%) que las muestras provenientes de Chiapas (valores entre 0.4 y 1.2%). Esto puede ser explicado por el tiempo de maduración para cada uno de los casos. Recordando que en el caso de Jalmich la maduración se da por 3 meses, tiempo en el cual bacterias ácido lácticas convierten los carbohidratos residuales en ácido láctico. En cambio en el caso de Chiapas la maduración se da por 3 días máximo, por lo que habría menos tiempo para las bacterias ácido lácticas de llevar a cabo la fermentación. En este valor se debe recalcar que la muestra C de nuevo parece tener una mayor similitud con las muestras provenientes de Michoacán y Jalisco. Y

en cuanto a los grupos significativamente diferentes (9 grupos) igualmente se diferencian fácilmente los grupos de Chiapas de los de Jalmich.

Una vez observadas estas tendencias, como en el caso del análisis fisicoquímico, se procedió a la realización del dendrograma mediante el método de Ward, el cual se presenta en la figura 20.

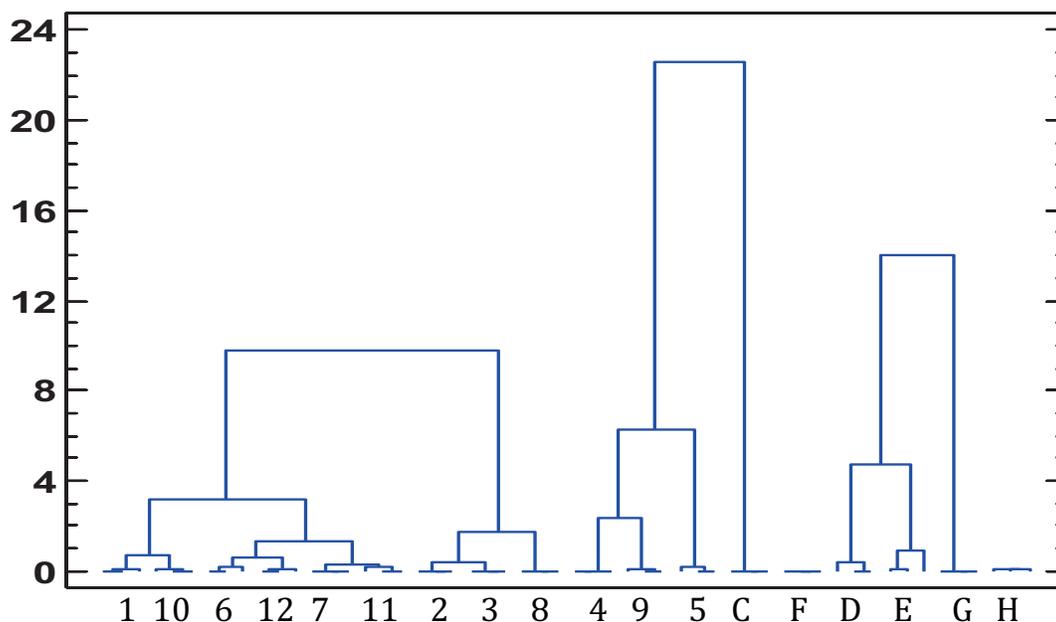


Figura 20. Dendrograma con los valores fisicoquímicos. Números, muestras Jalmich. Letras, muestras Chiapas

En el dendrograma se pueden observar diferentes grupos, pero lo relevante del análisis es que casi todas las muestras provenientes de Chiapas se ubican juntas en grupos por separado de las muestras provenientes de Jalmich. La única muestra de Chiapas que no entra dentro de lo previamente dicho es la muestra C, lo cual concuerda con los resultados previos.

### ***Análisis de la microbiota***

#### ***Extracción de ADN total de las muestras de queso***

En la Tabla 6 se muestran los valores tanto de concentración de ADN de cada muestra, como también los valores de la relación de absorbancia 260/280, la cual es un indicativo de la pureza de la extracción. Si el valor es  $\geq 1.8$  se considera al ADN como "puro". Cuando hay contaminación como presencia de altas concentraciones de proteína este valor disminuye. En este caso, los valores de la mayoría de las muestras se encuentran alrededor del valor esperado para este parámetro. Existen algunas muestras con valores mayores a dos lo que podría indicar una posible contaminación con ARN o ácidos orgánicos.

Tabla 6. Valores de concentración y pureza del ADN de la extracción

Muestra	Concentración (ng/ $\mu$ L)	Relación $A_{260/280}$
1	4.723	2.014
2	23.71	1.557
3	11.54	1.913
4	33.71	1.899
5	10.75	2.595
6	13.51	1.976
7	16.21	1.84
8	4.42	2.496
9	7.98	2.028
10	19.17	1.927
11	12.59	1.938
12	7.45	2.12
C	13.02	1.91
D	13.29	2.25
E	10.02	1.897
F	11.69	1.905
G	9.28	1.881
H	5.03	2.179

### PCR

Una vez determinada la concentración y pureza del ADN de las muestras después de la extracción, se realizó la amplificación. En las Figuras 21 y 22 se presentan los geles de agarosa para corroborar, la presencia, tamaño y pureza de los productos de reacción, mientras que en las Tablas 7 y 8 se presentan los valores de concentración, En todos los casos se observa el producto de reacción del tamaño esperado y como única banda en cada carril. Para el caso de la región V3 del 16S del ADNr el tamaño de amplicón esperado es de 220 pb, mientras que para el caso del gen *rpoB* es de 383 pb. En ambos casos uno de los cebadores tiene una grapa de 40 pb.

### Región V3 del 16S del ADNr

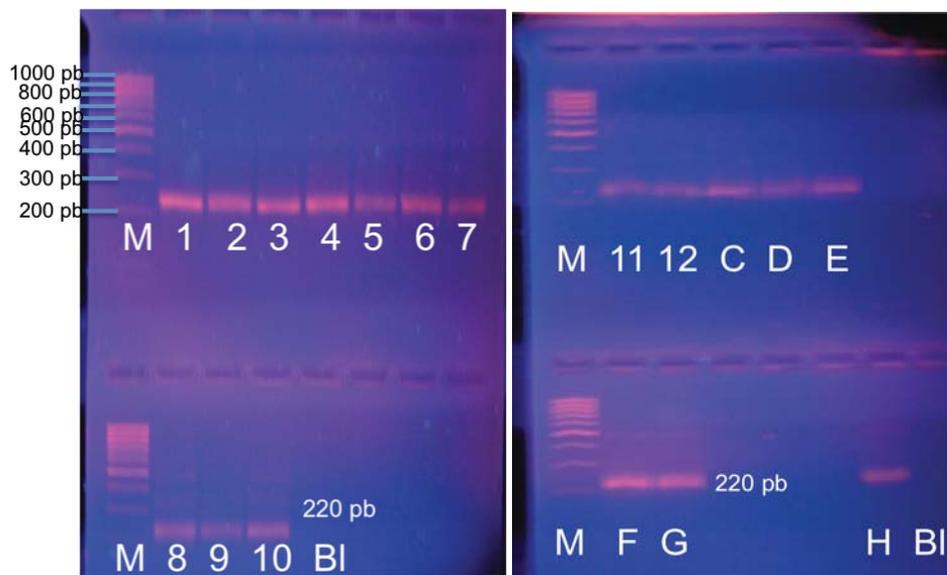


Figura 21. Geles de agarosa al 2% de los productos de PCR de los cebadores para la región V3 del 16S del ADNr. En cada carril se cargaron 4  $\mu$ L (M, marcador generuler 100bp DNA ladder. Números y letras muestras, BI es el Blanco de reacción)

Tabla 7. Valores de concentración y pureza de los productos de PCR de los cebadores para la región V3 del 16S del ADNr.

Muestra	Concentración (ng/ $\mu$ L)
1	641.58
2	768.3
3	349.96
4	377.96
5	425.9
6	482.38
7	600.58
8	651.46
9	493.26
10	412.61
11	624.27
12	640.15
C	613.06
D	452.74
E	444.3
F	492.06
G	446.1
H	479.92

***rpoB***

Tamaño de amplicón esperado 383 pb

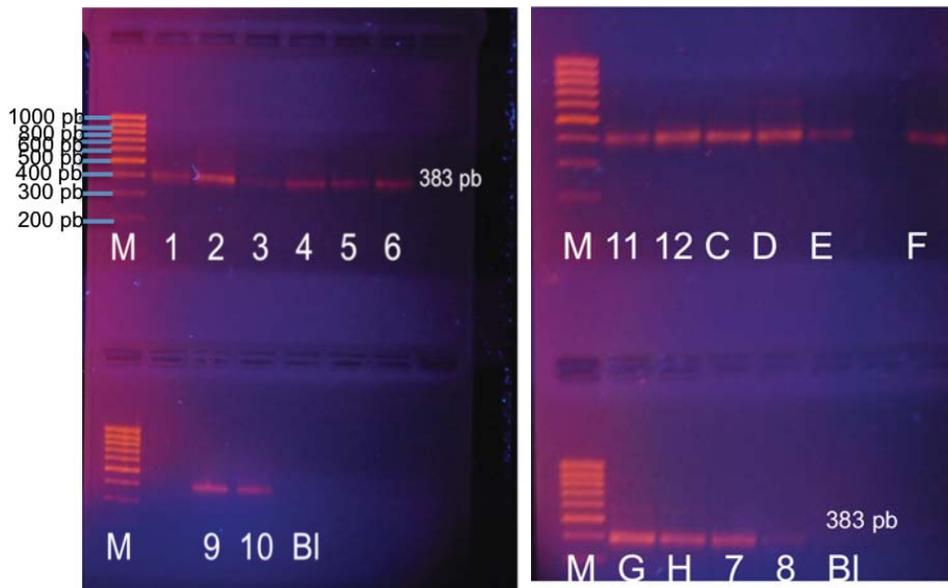


Figura 22. Geles de agarosa al 2% de los productos de PCR de los cebadores para el gen *rpoB*. En cada carril se cargaron 4  $\mu$ L (M, marcador generuler 100bp DNA ladder. Números y letras muestras, BI es el Blanco de reacción)

Tabla 8. Valores de las concentraciones y pureza de los productos de PCR de los cebadores para el gen *rpoB*

Muestra	Concentración (ng/ $\mu$ L)
1	582.17
2	440.61
3	392.82
4	901
5	238.79
6	339.26
7	738.28
8	541.56
9	350.78
10	667.8
11	454.12
12	733.84
C	455.46
D	462.48
E	231.62
F	985.7
G	458.8
H	426.2

### ***DGGE de los amplicones obtenidos***

- Establecimiento de las condiciones del gradiente de concentración

Se realizaron los geles perpendiculares tanto para los productos de la PCR con los cebadores que amplifican la región V3 del 16S del ADNr como para los productos de los cebadores que amplifican el gen *rpoB*. Los geles perpendiculares se realizan para encontrar el gradiente de concentración de los agentes desnaturizantes en el cual haya una mejor diferenciación y distinción de las diferentes bandas, que representan a distintos microorganismos, en una muestra dada. Se decidió que la concentración más baja utilizada en estos geles sería de 20%, mientras que la concentración más alta sería de 70%. En las figuras 23 y 24 presentan los geles perpendiculares obtenidos.

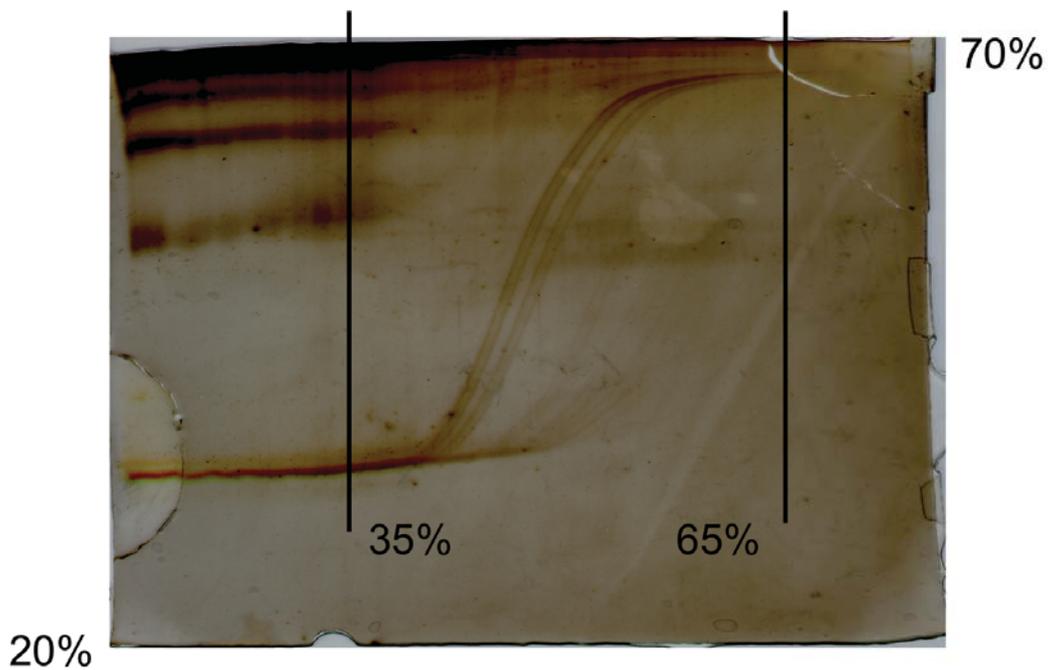


Figura 23. Gel perpendicular para los productos de PCR amplificados de la región V3 del 16S del ADNr

Al saber que el gradiente va de 20% a 70%, y tras medir en qué punto comienza a aparecer la curva sigmoidea que indica la desnaturización del ADN de la muestra, se decidió escoger un gradiente de 35% a 65% para el gel paralelo en el caso de los amplicones obtenidos con los cebadores para ADNr.

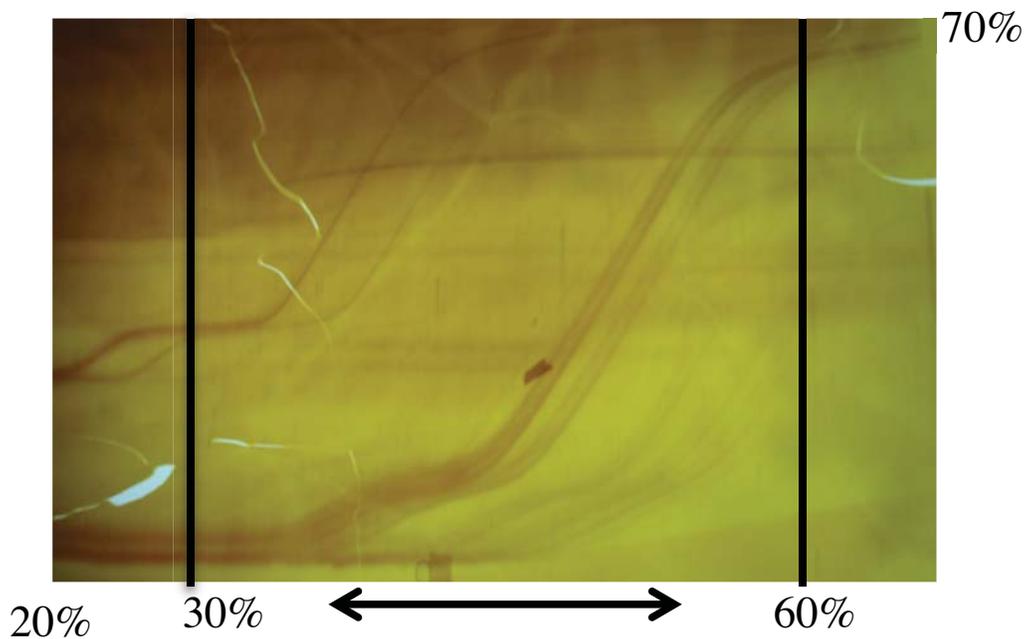


Figura 24. Gel perpendicular de los productos de PCR amplificados del gen *rpoB*

Por otro lado en el gel perpendicular para los amplicones obtenidos con los cebadores para el gen *rpoB*, teniendo en cuenta donde comienza la curva sigmoidea y donde se estabilizan, se decidió usar el gradiente de 30% a 60% para los geles paralelos. Una vez establecido el gradiente para cada gel paralelo (dependiendo de los amplicones utilizados) se decidió comenzar dichos ensayos.

- Geles paralelos

En la figura 25 se presenta un gel obtenido para las muestras de Chiapas, usando los amplicones de la región V3. El gel que contenía las muestras de Jalmich, así como los dos geles para el gen *rpoB* se presentan en el anexo número 6.

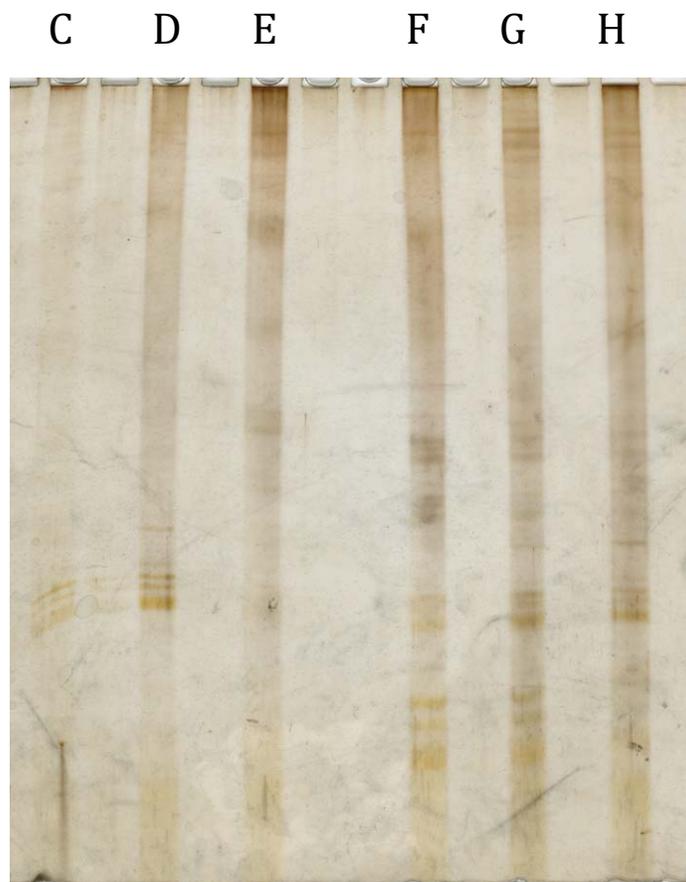


Figura 25. Gel paralelo de los productos de PCR amplificados del gen V3 de la región de Chiapas. Gradiente de 35% a 65% 80 V, 17 horas de corrida, 60°C . Letras muestras de Chiapas

Debido a la baja resolución de las bandas, se planteó la posibilidad de hacer una purificación a los productos de PCR previo a cargar el ADN en el DGGE. Al momento de purificar hay una pérdida en la concentración de ADN sustancial en los productos de PCR (hasta de un orden de magnitud), pero la relación 260/280 es o se acerca a 2. Debido a la pérdida de ADN se llegaron a cargar 300 ng de ADN por carril en los geles de DGGE, cantidad sugerida en el manual del sistema de DGGE utilizado, además de que también es la cantidad utilizada normalmente en estudios publicados. En las figuras 26 y 27 se presentan los geles obtenidos para las muestras de Jalmich y Chiapas, usando los amplicones de la región V3 purificados

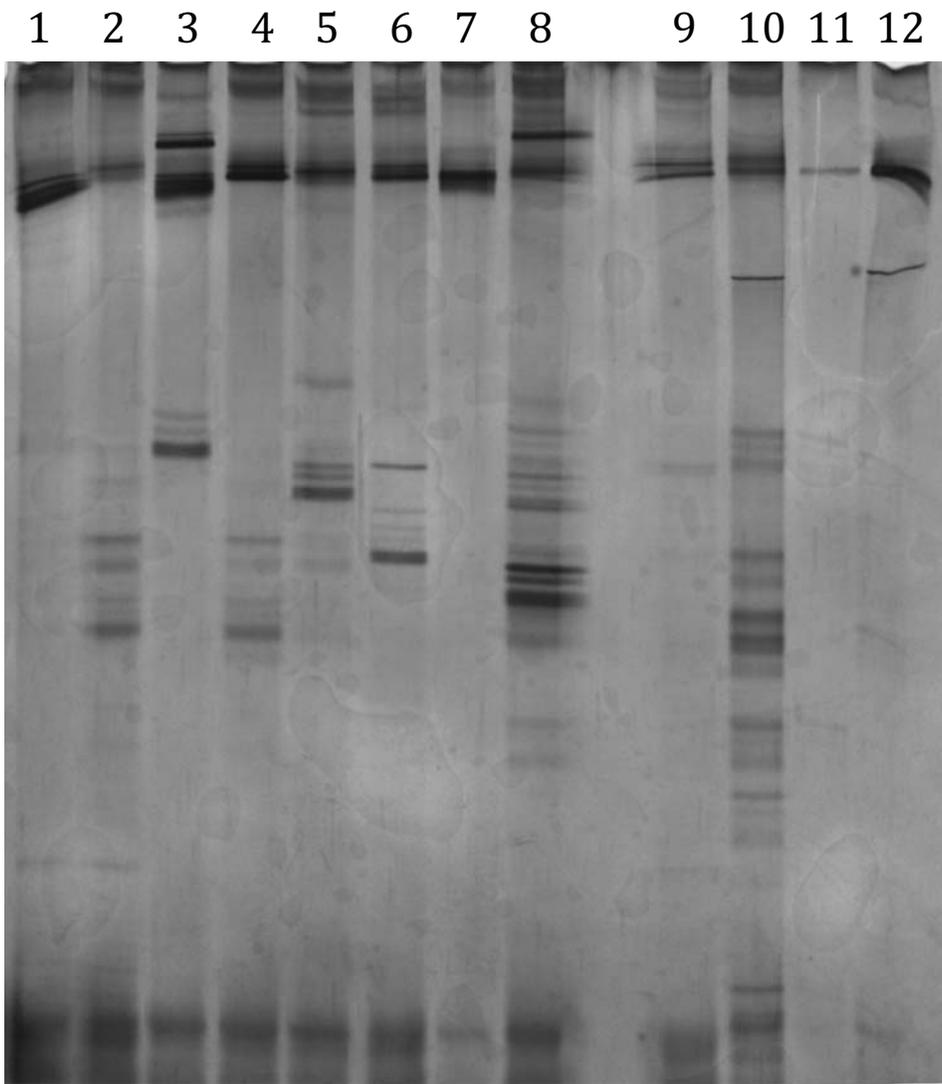


Figura 26. Gel paralelo de los productos de PCR amplificados del gen V3 de la región de Jalmich. Gradiente de 35% a 65% 80 V, 17 horas de corrida, 60°C . Números muestras de Jalmich

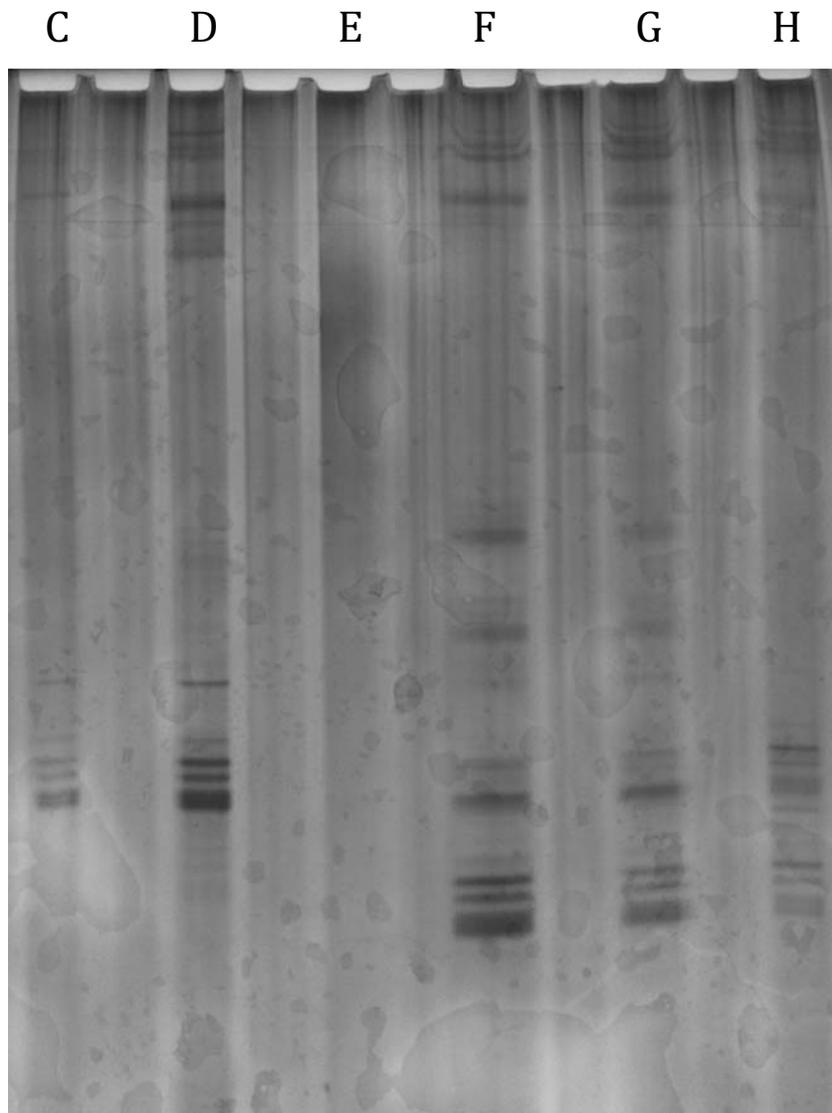


Figura 27. Gel paralelo de los productos de PCR amplificados del gen V3 de la región de Chiapas. Gradiente de 35% a 65% 80 V, 17 horas de corrida, 60°C. Letras muestras de Chiapas

En las figuras 28 y 29 se presentan los geles obtenidos para las muestras de Jalmich y Chiapas, usando los amplicones de la región *rpoB* purificados

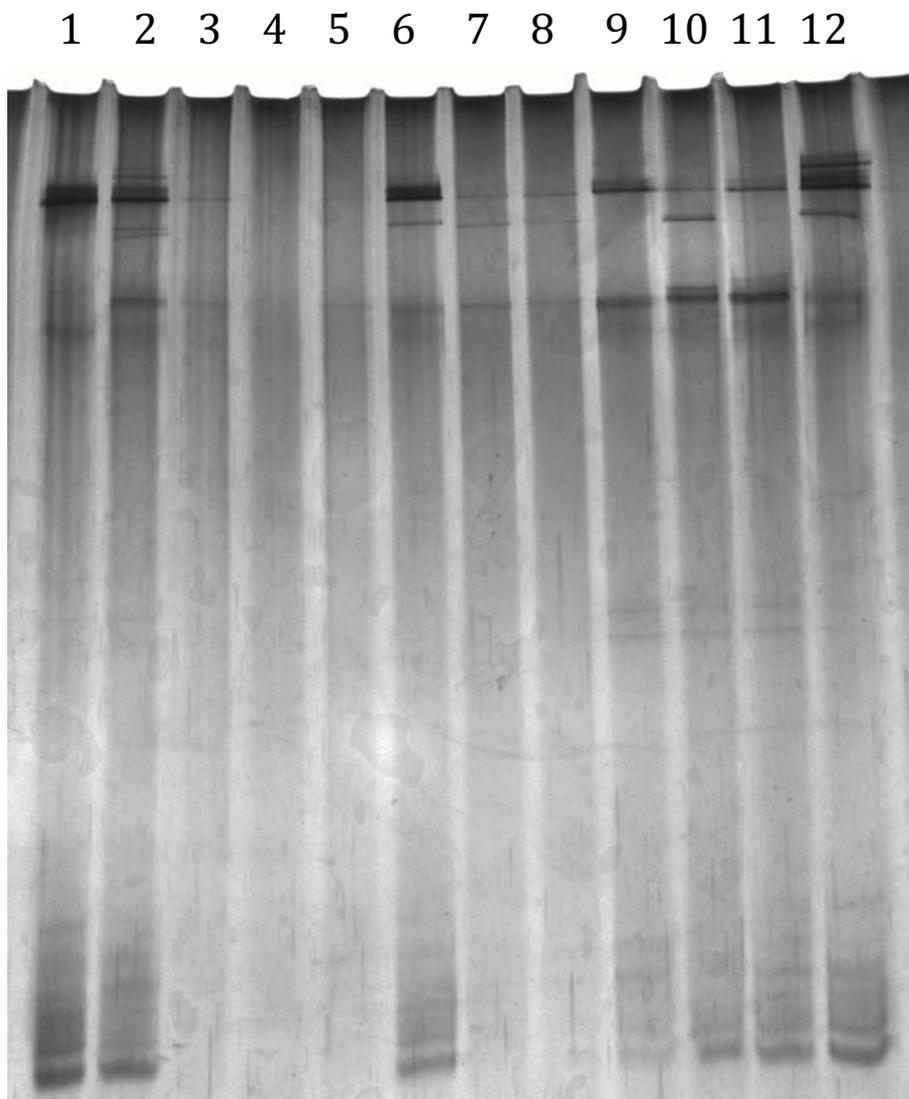


Figura 28. Gel paralelo de los productos de PCR amplificados del gen *rpoB* de la región de Jalmich. Gradiente de 35% a 60% 80 V, 17 horas de corrida, 60°C . Números muestras de Jalmich

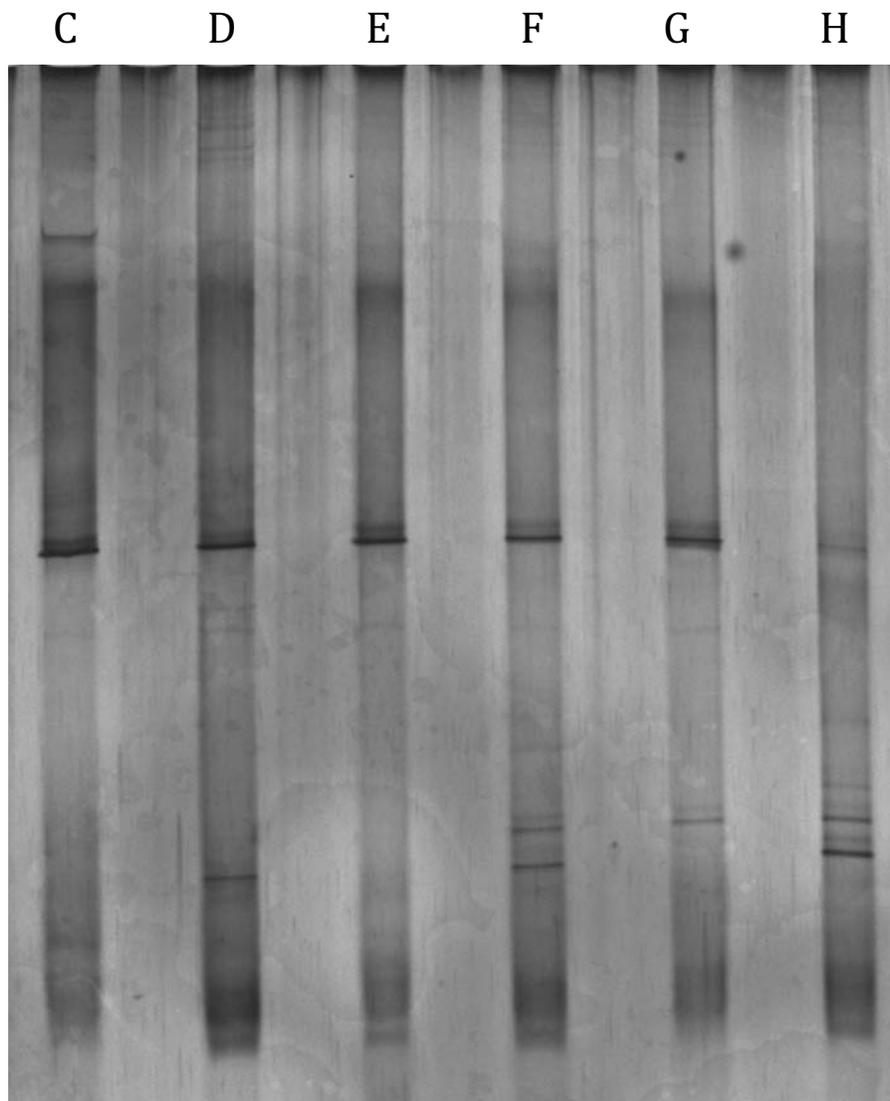


Figura 29. Gel paralelo de los productos de PCR amplificados del gen *rpoB* de la región de Chiapas. Gradiente de 30% a 60% 80 V, 17 horas de corrida, 60°C. Letras muestras de Chiapas

### **Análisis digital y secuenciación de bandas**

Una vez obtenidos los geles se procedió a su análisis, para lo cual con la ayuda del programa Diversity Database 2.2 de BioRad se pudieron identificar y comparar las bandas de los amplicones obtenidos. Se decidió presentarlas en forma digital para un mejor manejo de datos y un análisis más satisfactorio. En las figuras 30 a 33 se presentan las representaciones digitales (lado derecho) con los geles obtenidos (lado izquierdo).

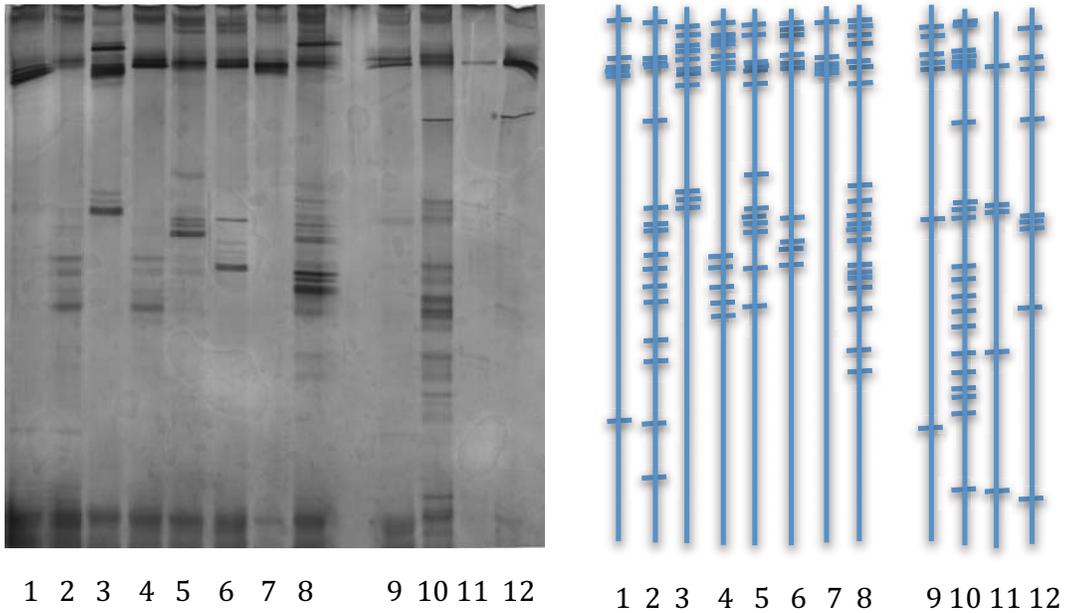


Figura 30. Izquierda gel paralelo de los productos de PCR amplificados del gen *V3* de la región de Jalmich. Derecha representación digital del gel.  
Número muestras de Jalmich

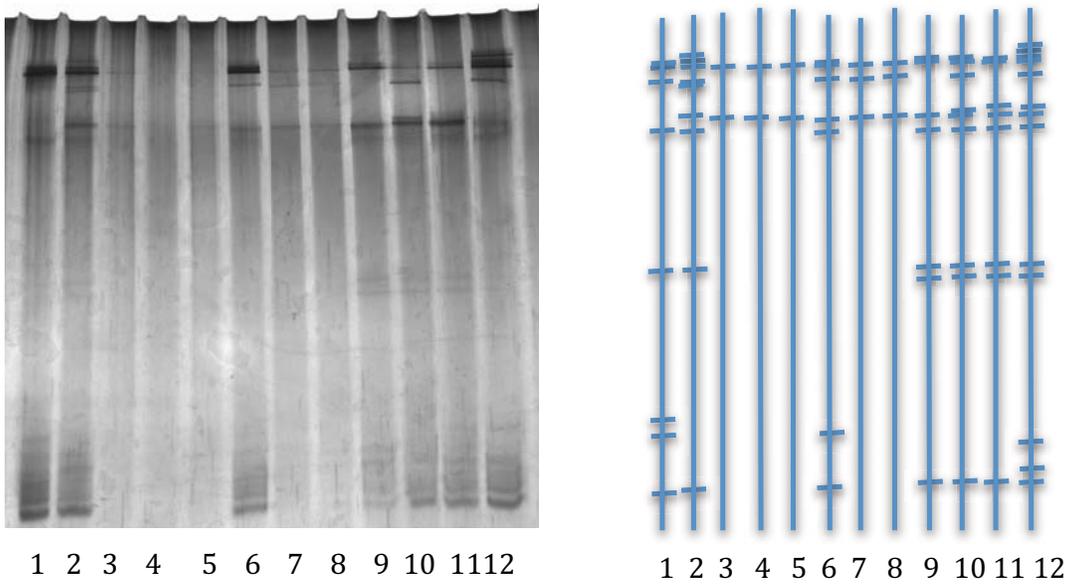


Figura 31. Izquierda gel paralelo de los productos de PCR amplificados del gen *rpoB* de la región de Jalmich. Derecha representación digital del gel.  
Número muestras de Jalmich

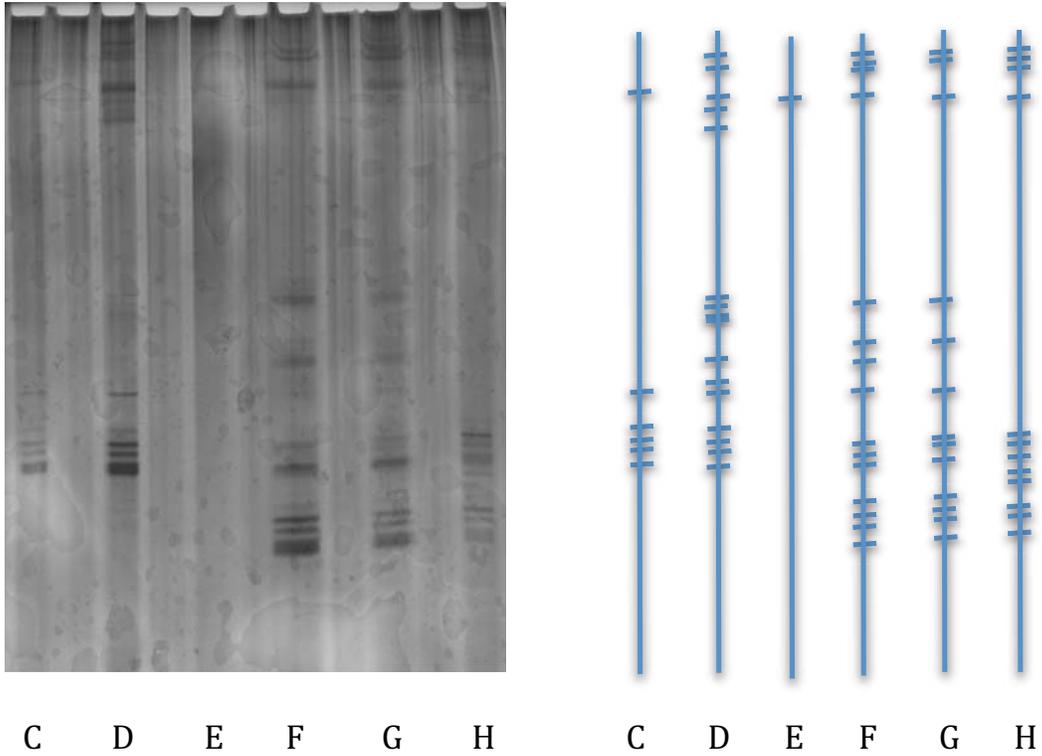


Figura 32. Izquierda gel paralelo de los productos de PCR amplificados del gen *V3* de la región de Chiapas. Derecha representación digital del gel.  
Letras muestras de Chiapas

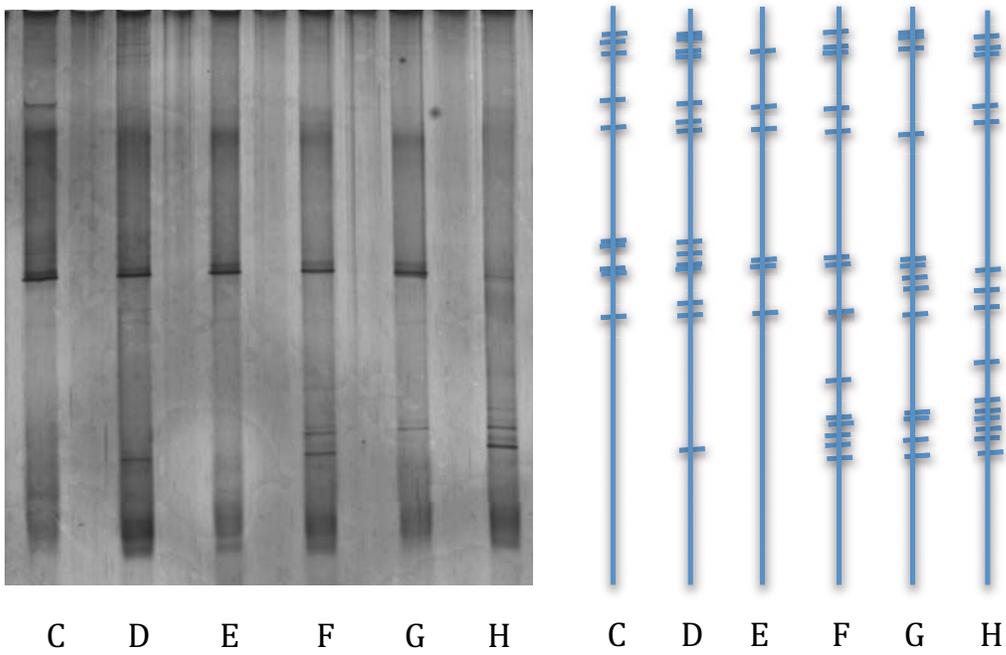


Figura 33. Izquierda gel paralelo de los productos de PCR amplificados del gen *rpoB* de la región de Chiapas. Derecha representación digital del gel.  
Letras muestras de Chiapas

Primero se compararon los patrones de bandas de muestras de la misma región, pero obtenidos con diferentes amplicones. En la figura 34 se observan los patrones de las muestras provenientes de Jalmich, amplificadas con cebadores para la región V3 del ADNr (izquierda) y amplificadas con cebadores para el gen *rpoB* (derecha).

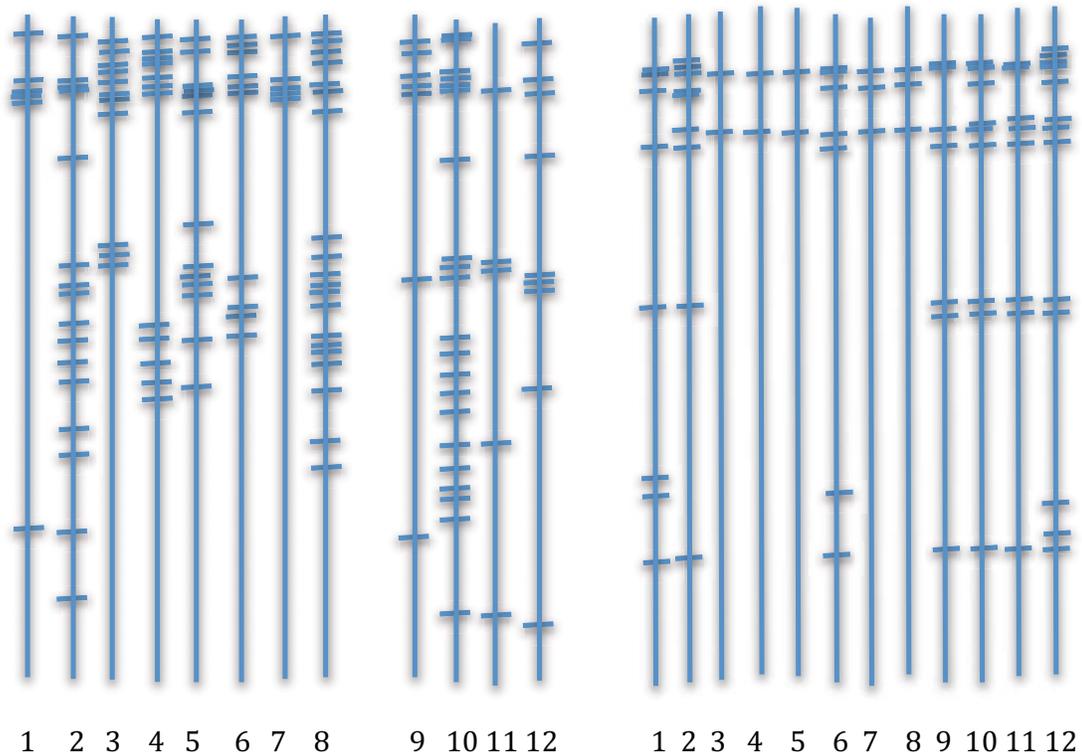


Figura 34. Patrón digital de bandas de las muestras de Jalmich. Izquierda amplicones 16S ADNr. Derecha amplicones *rpoB*

Al comparar cualitativamente los 2 geles obtenidos con los diferentes cebadores, se observa inmediatamente que parece haber una mayor cantidad de bandas por carril para los amplicones obtenidos con los cebadores de la región V3 de ADNr. Esto en comparación con la cantidad obtenida para los amplicones obtenidos con los cebadores del gen *rpoB*. Esto era de esperarse ya que el ADNr puede presentar microheterogeneidad (Wacher y Díaz Ruiz, 2003, Dahlluf *et al*, 2000) mientras que el gen *rpoB* está presente en unicopia en los microorganismos.

En la figura 35 se observan los patrones de las muestras provenientes de Chiapas, amplificadas con cebadores para la región V3 del ADNr (izquierda) y amplificadas con cebadores para el gen *rpoB* (derecha).

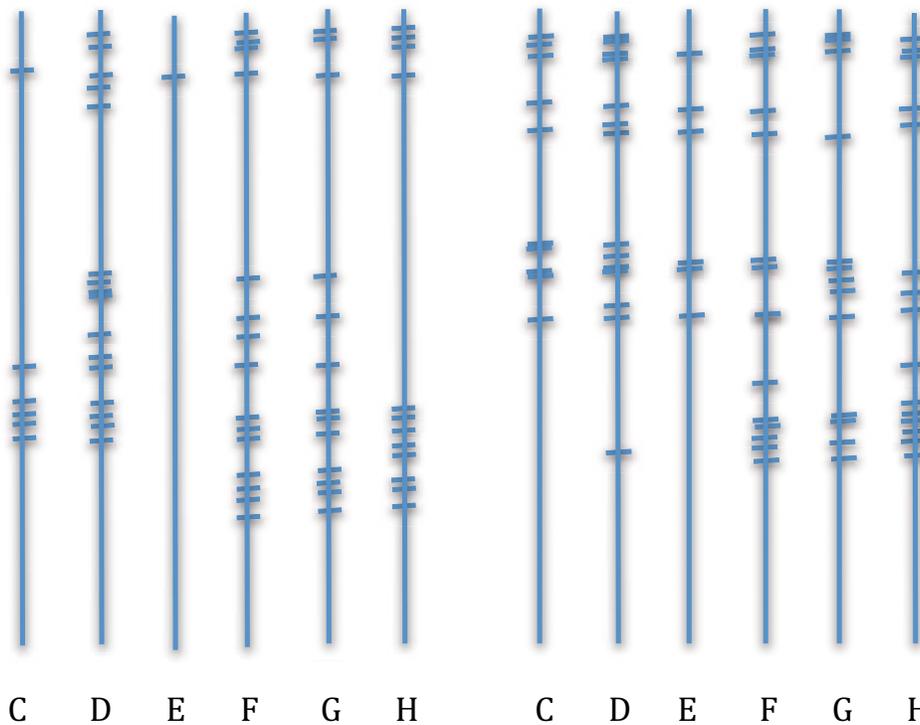


Figura 35. Patrón digital de bandas de las muestras de Chiapas. Izquierda amplicones 16S ADNr. Derecha amplicones *rpoB*

En la comparación de las muestras provenientes de Chiapas, se observa el mismo comportamiento que en el caso de las provenientes de Jalmich, es decir, hay una mayor cantidad de bandas por carril para el caso de los amplicones obtenidos con los cebadores para la región V3 del ADNr en comparación con las bandas obtenidas usando los cebadores del gen *rpoB*, aunque no tan marcada como en el caso anterior. Se procedió a analizar las muestras provenientes de Jalmich frente a las provenientes de Chiapas, en cuanto a la diversidad y dominancia de la microbiota en los quesos para diferenciar los quesos de las dos zonas geográficas a nivel de población microbiana.

*Análisis de las poblaciones de la región V3 del ADNr*

En la figura 36 se presentan los patrones digitales de las bandas obtenidas mediante el uso de los cebadores para la región V3 del ADNr.

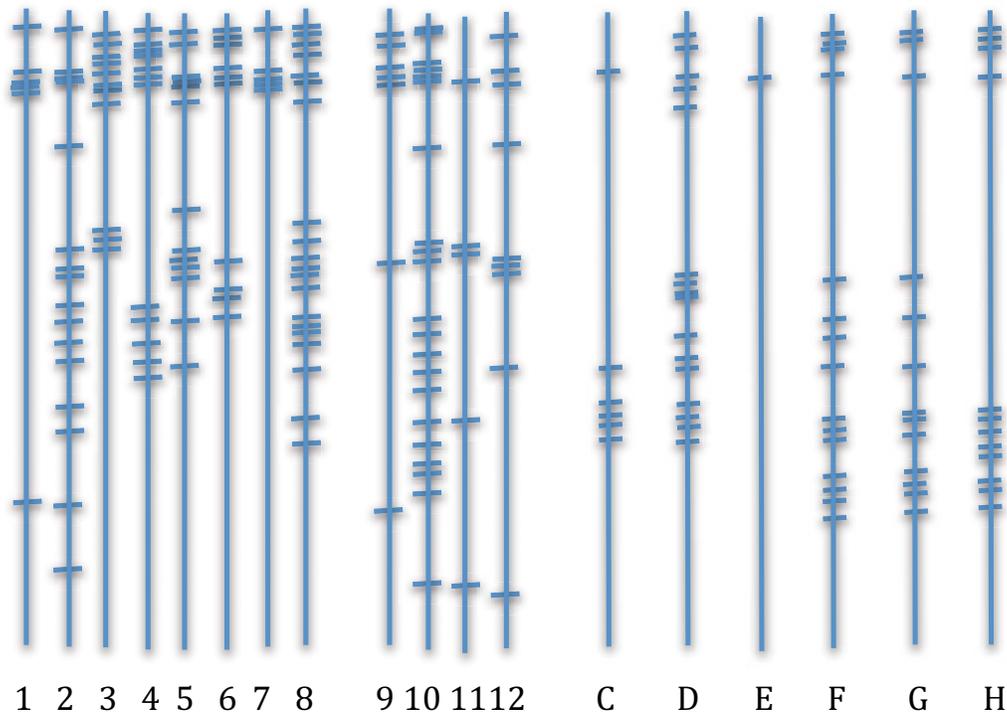


Figura 36. Patrón digital de bandas obtenidas con los cebadores para la región V3 del ADNr. Números: muestras de Jalmich. Letras: muestras de Chiapas

En un análisis cualitativo se observa que algunos patrones de bandas se repiten en todos los carriles, lo que hace pensar que, especialmente en el caso de los quesos de Jalmich, algunos microorganismos están presentes en todas o casi todas las muestras.

Los patrones obtenidos de las muestras provenientes de Chiapas y de Jalmich parecen diferentes a simple vista, pero para introducir elementos cuantitativos en el análisis se procedió a enumerar todas las bandas de los carriles con la ayuda del software Diversity Database. En la amplificación de la región V3 del ADNr se generaron 37 bandas diferentes y se realizó una matriz binaria de ausencia (0) y presencia (1) por cada carril. En la tabla 9 se presenta dicha matriz.

Tabla 9. Matriz Binaria para las bandas obtenidas con los cebadores para la región V3 del ADNr  
 Primer renglón muestras. Números: muestras de Jalnich. Letras: muestras de Chiapas. Primera fila número de  
 bandas. Demás celdas 1: presencia de banda, 0 ausencia de banda

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C	D	E	F	G	H
1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
2	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
5	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
8	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
13	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
16	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1
17	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
18	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
19	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
20	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0
22	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
23	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0
24	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
28	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
29	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
31	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
36	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0

Una vez obtenida esta matriz se procedió a calcular con los valores, índices de distancias, lo que permitiría el trazado de un dendrograma. Los índices escogidos para la valoración fueron los de Jaccard y el de Sorensen- Dice. El índice de Jaccard se calcula mediante la siguiente expresión

$$J = \frac{TotN_{AB}}{N_A + N_B - TotN_{AB}}$$

Donde:

TotN<sub>AB</sub> = Al número de bandas que comparten los dos carriles a considerar

N<sub>A</sub> = Al número de bandas del carril A

N<sub>B</sub> = Al número de bandas del carril B|

En la tabla 10 se presentan los valores de Índice de Jaccard para todos los carriles (muestras de Queso Cotija).

El otro índice utilizado, para comprobar de manera más certera la construcción del dendrograma, fue el de Sorensen- Dice. Éste se calcula mediante la siguiente ecuación

$$SD = \frac{2TotN_{AB}}{N_A + N_B}$$

En la tabla 11 se presentan los valores del Índice de Sorensen- Dice para todos los carriles (muestras de queso Cotija).

Tabla 10. Valores del Índice de Jaccard

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C	D	E	F	G	H
1	0.222	0.214	0.125	0.188	0.231	0.375	0.125	0.364	0.125	0.1	0.071	0.091	0.048	0.167	0.105	0.105	0.125
2*		0.125	0.333	0.261	0.13	0.167	0.233	0.316	0.276	0.105	0.25	0.158	0.185	0.063	0.24	0.24	0.12
3*	*		0.278	0.412	0.313	0.231	0.28	0.333	0.185	0.143	0.176	0.063	0.125	0.091	0.182	0.182	0.211
4*	*	*		0.25	0.222	0.133	0.222	0.235	0.138	0.063	0.167	0.059	0.273	0.083	0.286	0.286	0.2
5*	*	*	*		0.278	0.2	0.417	0.294	0.259	0.2	0.294	0.118	0.261	0.077	0.273	0.273	0.136
6*	*	*	*	*		0.25	0.348	0.357	0.24	0.154	0.267	0.067	0.182	0.1	0.136	0.136	0.158
7*	*	*	*	*	*		0.13	0.4	0.182	0.111	0.077	0.1	0.05	0.2	0.053	0.053	0.063
8*	*	*	*	*	*	*		0.25	0.4	0.13	0.2	0.174	0.233	0.048	0.385	0.385	0.179
9*	*	*	*	*	*	*	*		0.304	0.077	0.286	0.071	0.087	0.111	0.2	0.2	0.235
10*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.182	0.304	0.174	0.233	0.048	0.2	0.2	0.179
11*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.167	0.222	0.105	0.2	0.111	0.111	0.133
12*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.071	0.19	0.111	0.143	0.143	0.105
C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.375	0.167	0.313	0.313	0.286
D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.063	0.409	0.409	0.273
E	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.067	0.067	0.083
F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		1	0.588
G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.588
H	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

Tabla 11. Valores del Índice de Sorensen- Dice

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C	D	E	F	G	H
1	0.364	0.353	0.222	0.316	0.375	0.545	0.222	0.533	0.222	0.182	0.133	0.167	0.091	0.286	0.19	0.19	0.222
2*		0.222	0.5	0.414	0.231	0.286	0.378	0.48	0.432	0.19	0.4	0.273	0.313	0.118	0.387	0.387	0.214
3*	*		0.435	0.583	0.476	0.375	0.438	0.5	0.313	0.25	0.3	0.118	0.222	0.167	0.308	0.308	0.348
4*	*	*		0.4	0.364	0.235	0.364	0.381	0.242	0.118	0.286	0.111	0.429	0.154	0.444	0.444	0.333
5*	*	*	*		0.435	0.333	0.588	0.455	0.412	0.333	0.455	0.211	0.414	0.143	0.429	0.429	0.24
6*	*	*	*	*		0.4	0.516	0.526	0.387	0.267	0.421	0.125	0.308	0.182	0.24	0.24	0.273
7*	*	*	*	*	*		0.231	0.571	0.308	0.2	0.143	0.182	0.095	0.333	0.1	0.1	0.118
8*	*	*	*	*	*	*		0.4	0.571	0.231	0.333	0.296	0.378	0.091	0.556	0.556	0.303
9*	*	*	*	*	*	*	*		0.467	0.143	0.444	0.133	0.16	0.2	0.333	0.333	0.381
10*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.308	0.467	0.296	0.378	0.091	0.333	0.333	0.303
11*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.286	0.364	0.19	0.333	0.2	0.2	0.235
12*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.133	0.32	0.2	0.25	0.25	0.19
C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.545	0.286	0.476	0.476	0.444
D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.118	0.581	0.581	0.429
E	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.125	0.125	0.154
F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		1	0.741
G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

En los dos índices se observa una correlación en cuanto a sus valores, ya que presentan el valor más alto, lo que significa mayor similitud (comparación carril G y F) y más bajo, lo que significa mayor diferenciación (comparación carril 8 y E) para los mismos casos.

Una vez calculados los índices se procedió a la construcción del dendrograma, para lo que se utilizó el método de UPGMA, que por sus siglas en inglés significa método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada. El dendrograma se obtuvo mediante la utilización del programa DendroUPGMA (<http://genomes.urv.es/UPGMA/>). En este caso los valores se anotaron en formato FASTA y se procedió al análisis.

En la figura 37 se presenta el dendrograma obtenido

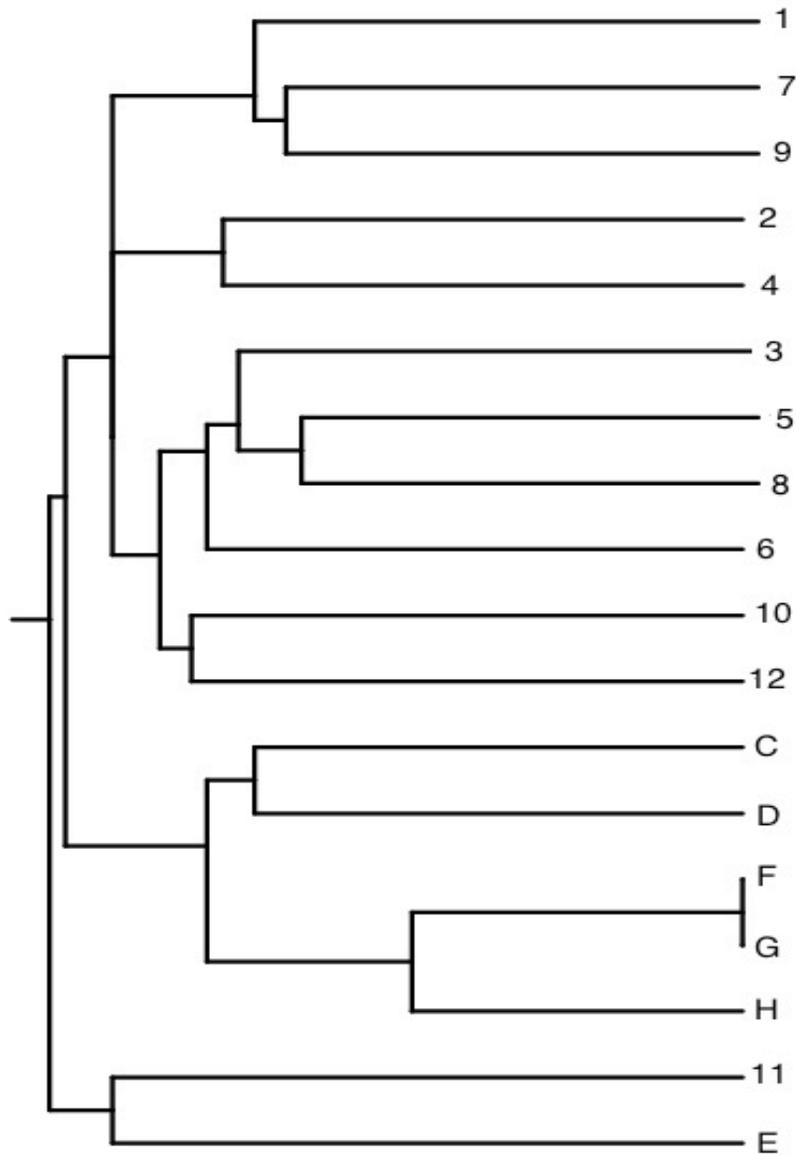


Figura 37. Dendrograma para las muestras de Queso Cotija de acuerdo a los amplicones obtenidos de la región V3 del ADNr. Números: muestras de Jalmich. Letras: muestras de Chiapas

En el dendrograma se observa una clara diferenciación entre las muestras provenientes de Jalmich (números) y las muestras provenientes de Chiapas (letras), salvo por la muestra 11 que comparte rasgos en cuanto al patrón de bandeo con las muestras provenientes de Chiapas. El dendrograma muestra 2 grupos muy bien definidos, en el primero se agrupan casi todas las muestras provenientes de la Sierra de Jalmich, mientras que en el otro cluster se agrupan todas las muestras provenientes de Tonalá y sus alrededores. Este comportamiento da pauta a proponer que sólo por su patrón de bandeo las muestras de Jalmich y de Chiapas pueden ser significativamente diferentes en cuanto a su población microbiológica, lo cual debe ser comprobado mediante la secuenciación de bandas a elegir.

La selección de bandas para enviar a secuenciación se realizó mediante la ayuda de los programas Diversity Database 2.2 y GelDoc de BioRad, los muestran la intensidad de las bandas, con lo cual se puede hacer un comparación. Así pues se seleccionaron las bandas que tuvieran una mayor definición, que pudieran ser predominantes en la mayoría de los carriles, además de bandas representativas de los dos grupos de muestras diferentes. Para el caso de la dominancia ésta se calculó como la suma de la intensidad relativa promedio (IRp) de cada banda (dado por el algoritmo Diversity Data Base), dividida entre el número de individuos que conforman la comunidad bacteriana de cada muestra. Este parámetro permite clasificar a los individuos de cada muestra como dominantes si su valor se encuentra sobre el promedio y no dominantes si se encuentra bajo el promedio. Los valores de IRp se encuentran en el anexo 7.

Se seleccionaron 18 bandas que en la figura 38 se remarcan con color rojo en el patrón digital de bandeo.

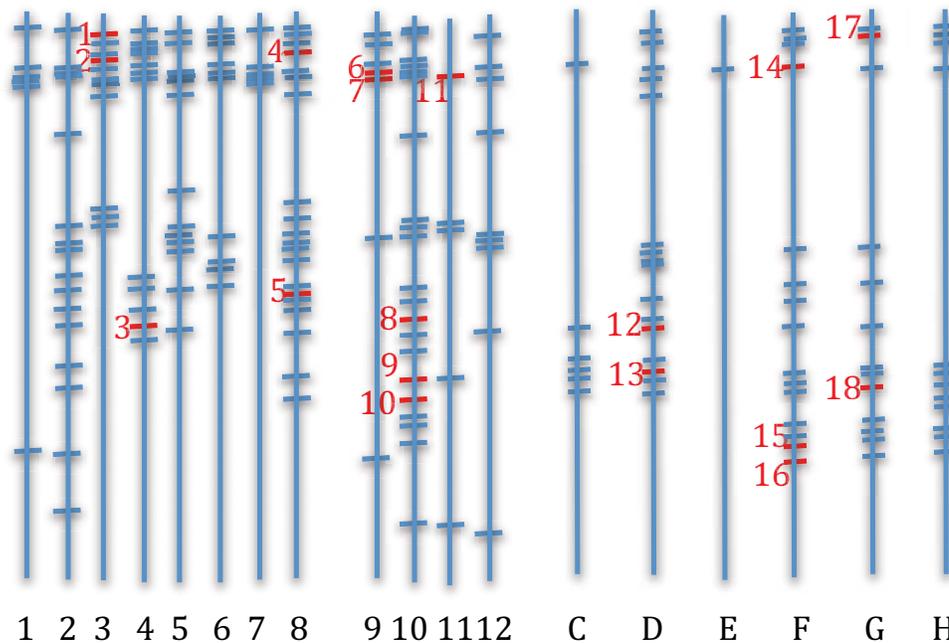


Figura 38. Patrón digital de bandas obtenidas con los cebadores para la región V3 del ADNr con bandas en rojo seleccionadas para secuenciar. Números: muestras de Jalmich. Letras: muestras de Chiapas

En la tabla 12 se presentan los resultados de la identificación de los microorganismos con el porcentaje de mayor identidad a las secuencias de las bandas seleccionadas.

Tabla 12. Microorganismos encontrados en las bandas mandadas a secuenciar de los cebadores de v3

Carril	Num. De banda	Identidad	%ID
3	1	<i>Vagococcus sp</i>	95
4	3	<i>Bacillus sp.</i>	96
8	4	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	98
8	5	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	97
9	6	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	96
9	7	<i>Bacillus sp</i>	95
10	9	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	97
10	10	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	97
11	11	<i>Bacillus vietnamensis</i>	94
D	12	<i>Bacillus sp</i>	98
D	13	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	97
F	14	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	100
F	15	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	97
F	16.1	<i>Bacillus sp</i>	91
F	16.2	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	98
G	17	<i>Bacillus sp</i>	92
G	18	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	92

De las 18 bandas seleccionadas, la banda número 2 no pudo ser identificada debido a un bajo nivel de confiabilidad. La banda 16 se dividió en dos.

Entre las bandas identificadas se puede observar la presencia del género *Bacillus* en los quesos provenientes de la región de Chiapas y de la región de la Sierra de Jalmich. Dicho género ha sido encontrado en estudios anteriores en los quesos provenientes de la región de Jalisco y Michoacán. García Saturnino encontró a las especies *Bacillus subtilis* (en cuajada y en sal de grano) y a *Bacillus pumilus* (en la cuajada). Estos microorganismos tienen tanto actividad proteolítica como lipolítica. De acuerdo a estos estudios el género *Bacillus* puede llegar a ser incorporado en el proceso de salado, pero además se ha encontrado que está presente durante todo el proceso de la elaboración del queso Cotija. Hay que recalcar que el género *Bacillus* abarca una gran cantidad de especies (Ash *et al* logró agrupar hasta a 51 especies diferentes utilizando el gen 16S del ADNr), por lo cual es de esperarse encontrar este género en las dos zonas de estudio.

Se logró identificar a la especie *Bacillus vietnamensis*. Esta especie es una bacteria Gram positiva, catalasa positiva y aeróbica, la cual es considerada halotolerante debido a que puede crecer en concentraciones de cloruro de sodio de hasta 15% y en un rango de pH entre 6.5 y 10. Ha sido aislado de sal marina y salsa de pescado, además de haberse encontrado en muestras de mar provenientes del Golfo de México (Noguchi H. *et al*, 2004). No produce ácido a partir de lactosa, pero puede utilizarla como fuente de carbono (Cerritos R. *et al*, 2008). Con base en esta

información se podría deducir que la especie se introduce al producto en el proceso de salado. Esta especie en específico únicamente se logró identificar en la región de la Sierra de Jalmich.

Un nuevo grupo que llama la atención es el encontrado y catalogado como *Virgibacillus*, el cual es un bacilo Gram positivo aeróbico, catalasa positivo que puede llegar a crecer en altas condiciones de sal (2-23%) y en un rango de pH entre 5.8 y 9.6. El género *Virgibacillus* formaba parte del género *Bacillus*, pero en 1998 por diferencias tanto fenotípicas como genotípicas fue catalogado en su propio grupo. Este microorganismo se ha logrado aislar de carne de pescado, agua y sal marina (Yoon *et al* 2004). Previamente, dicho microorganismo, no se había identificado en el grupo de trabajo, pero por el uso de sal de mar en la elaboración de algunos de los quesos (en especial los provenientes de la sierra de Jalmich) es posible pensar que dicho microorganismo de ahí tiene su origen. Está presente en las muestras provenientes de Chiapas, lo que puede ser explicado debido a que Tonalá y sus alrededores son regiones costeras con un ambiente salino, lo que podría permitir la incorporación del microorganismo al producto en cualquiera de sus fases de manufactura. Los resultados obtenidos con esta especie son un claro ejemplo del problema de la microheterogeneidad previamente discutido, ya que se presenta en bandas con diferente perfil diferencial de desnaturalización (Tm) en un mismo carril y al hacer comparaciones entre carriles diferentes. Esto podría ser un indicio de que el microorganismo posee varias copias del gen 16S del ADNr.

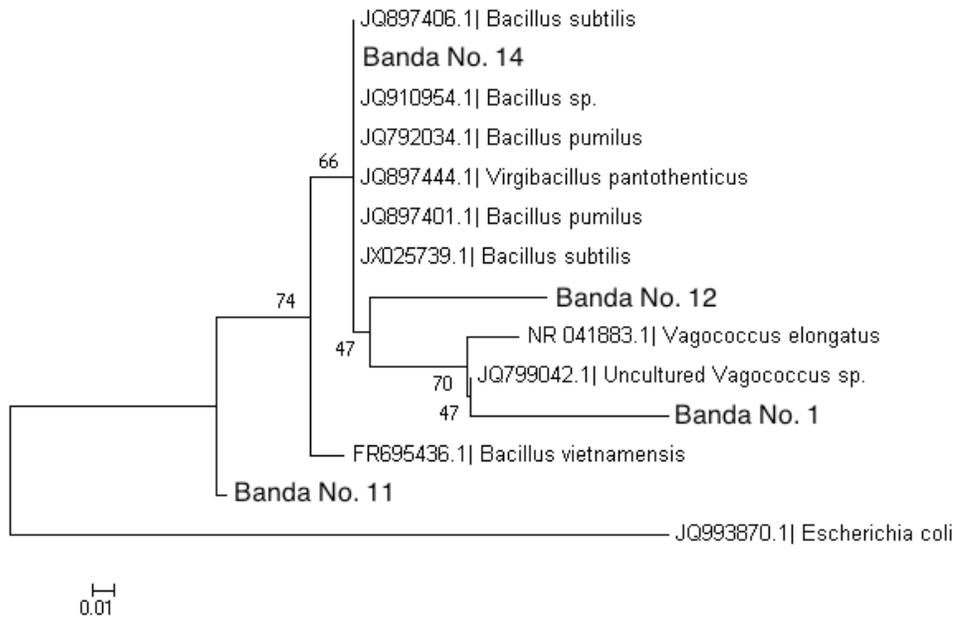
Por último encontramos al género *Vagococcus*. Es una bacteria ácido láctica Gram positiva, catalasa negativa, anaerobia facultativa, homofermentativa. Se ha detectado su presencia en ambiente de granja (Campbell *et al.* 1996) además de en ambiente marino (Mace *et al.* 2012), por lo que se podría conjeturar que proviene de la sal utilizada, pero con más seguridad a las prácticas de manejo de la leche (ordeña, manejo de la leche una vez ordeñada, almacenamiento). Este género se había logrado identificar previamente por Zúñiga en el queso Cotija en el año 2009.

Zúñiga, como se mencionó previamente, identificó a ciertos géneros y especies mediante DGGE presentes en queso Cotija con diferentes tiempos de maduración. Estas especies fueron *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y a los géneros *Vagococcus* y *Marinilactibacillus*. Dichas especies se presentaron en los tiempos estudiados en el queso. Al comparar los resultados obtenidos con los de Zúñiga se observa que se encuentra al género *Vagococcus*, pero que mediante el uso de los cebadores para la región V3 no se logró encontrar en esta ocasión a los géneros *Enterococcus* y *Marinilactibacillus*.

Se observa que algunas bandas que aparecen en varios carriles a la misma altura no son el mismo microorganismo, lo cual puede ser debido a una agitación deficiente en el tanque del aparato de DGGE. Este problema provoca que no haya uniformidad de temperatura en todo el gel y diferencias mínimas pueden ocasionar lo suscitado. Se aprecia también que bandas a distintas alturas poseen la misma identidad. Al analizar las secuencias se aprecia que llegan a haber hasta 15 diferencias en las bases, pero que al ser comparadas con la base de las secuencias muestran identificación positiva con el mismo microorganismo. Esta circunstancia

puede ser explicada debido a la microheterogeneidad que presenta el ADNr, pero de igual forma a una amplificación incompleta del fragmento de ADN en la PCR.

Una vez realizada la secuenciación se realizó la construcción de los árboles filogenéticos. Se realizó un análisis de agrupamiento para poder obtener un árbol consenso, el cual se obtuvo por el método de Neighbor-Joining. Se utilizaron las secuencias amplificadas de la región V3 del ADNr provenientes de algunas bandas seleccionadas de los geles obtenidos de DGGE. Para llevar a cabo esto, se utilizó el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 5.05. Un total de 14 fragmentos se analizaron, de los cuales 4 provenían de secuencias de bandas y 10 de secuencias obtenidas del GenBank que corresponden a diferentes géneros de bacterias elegidas por ser especies previamente identificadas dentro del grupo de trabajo (García, 2006; Zúñiga 2009) o por ser especies con alta similitud al grupo de bacterias que se identificaron. La inferencia filogenética de las secuencias de las bandas 1, 11, 12 y 14 se llevó a cabo por un análisis de Bootstrap con 1000 remuestreos, el cual se presenta en la Figura 39. Este análisis coloca a la banda número 1 (identificada como *Vagococcus*) dentro del género *Vagococcus* por lo que podría decirse que se obtuvo una identificación adecuada a nivel de género. Para el caso de las banda número 12 y 14 (*Virgibacillus pantothenicus* y *Bacillus* sp.) se agrupan dentro del género *Bacillus*, que también contiene a un *Virgibacillus* proveniente del GenBank, esto puede deberse a que son géneros con una alta similitud que recientemente fueron separados en dos géneros distintos. Por último en el caso de la banda número 11 (*Bacillus vietnamensis*) cae fuera del grupo conferido al género *Bacillus*, pero igualmente sucede con el *Bacillus vietnamensis* proveniente del GenBank y se encuentra cercano a éste, por lo que se considera una identificación satisfactoria.



**Figura 39.** Relación filogenética de las bacterias identificadas por la secuenciación de bandas de la región V3 del gen ADNr 16S en el estudio del Queso Cotija. La relación filogenética fue inferida usando el método de Neighbor-Joining (Saitou N y Nei, 1987). El árbol consenso inferido de entre 1,000 remuestreos representa la relación entre las 28 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 durante el análisis por bootstrap con 1,000 remuestreos (Felsenstein, 1985). La distancia de la relación fue calculada usando el método de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993). Todas las posiciones que contenían gaps fueron eliminadas del grupo de secuencias analizadas. Cada una de las secuencias analizadas tenía 84 posiciones. El análisis fue realizado empleando el programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

### Análisis de las poblaciones con el gen *rpoB*

En la Figura 40 se presentan los patrones digitales de las bandas obtenidas mediante el uso de los cebadores para el gen *rpoB*.

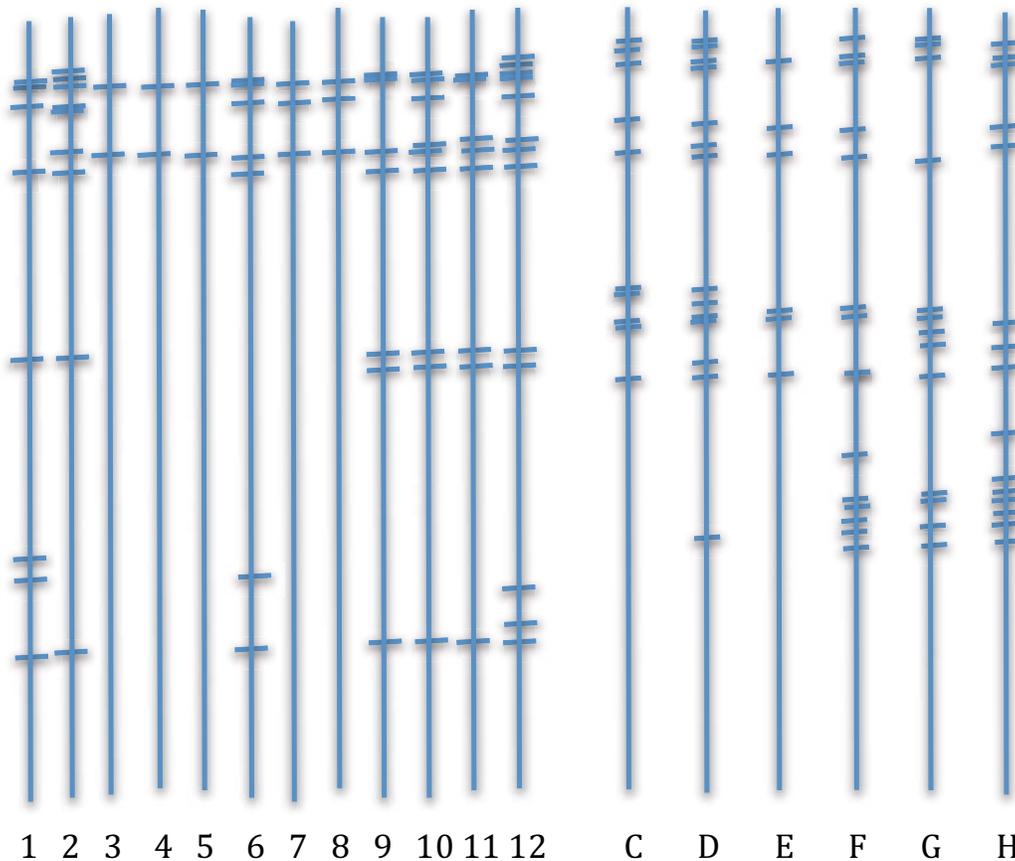


Figura 40. Patrón digital de bandas obtenidas con los cebadores para el gen *rpoB*. Números: muestras de Jalmich. Letras: muestras de Chiapas

De igual forma que para la región V3 en el análisis cualitativo se observa que algunos patrones de bandas se repiten en todos los carriles (muestras provenientes de Jalmich y Chiapas), lo que hace pensar también que algunos microorganismos están presentes en todas o casi todas las muestras. Es notable que parece ser que en su mayoría los patrones obtenidos de las muestras provenientes de Chiapas y de Jalmich son diferentes.

Para analizar los patrones de una manera cuantitativa se enumeraron todas las bandas de los carriles con la ayuda del Diversity Database®, para este caso se cuantificaron únicamente 13 diferentes bandas. Posteriormente se realizó la matriz binaria de ausencia (0) y presencia (1) por cada carril. En la tabla 13 se presenta dicha matriz.

Tabla 13. Matriz Binaria para las bandas obtenidas con los cebadores para el gen *rpoB*  
 Primer renglón muestras. Números: muestras de Jalnich. Letras: muestras de Chiapas. Primera fila número de  
 bandas. Demás celdas 1: presencia de banda, 0 ausencia de banda

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C	D	E	F	G	H
1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
2	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
4	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
7	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
10	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
13	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1

Una vez obtenida esta matriz se procedió a calcular con los valores los índices de distancias (Jaccard y el de Sorensen- Dice). En las tablas 14 y 15 se presentan los valores de Índice de Jaccard y de Sorensen Dice, respectivamente, para todos los carriles (muestras de Queso Cotija).

Tabla 14. Valores del Índice de Jaccard

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C	D	E	F	G	H
1	0.545	0.111	0.111	0.222	0.5	0.222	0.222	0.5	0.545	0.417	0.4	0	0	0	0	0	0
2	*	0.1	0.1	0.2	0.455	0.2	0.2	0.455	0.636	0.5	0.571	0.056	0.048	0	0.045	0	0.091
3	*	*	1	0.667	0.286	0.667	0.667	0.286	0.222	0.222	0.154	0.091	0.071	0.143	0.067	0.071	0
4	*	*	*	0.667	0.286	0.667	0.667	0.286	0.222	0.222	0.154	0.091	0.071	0.143	0.067	0.071	0
5	*	*	*	*	0.429	1	1	0.25	0.333	0.2	0.231	0.083	0.067	0.125	0.063	0.067	0
6	*	*	*	*	*	0.429	0.429	0.273	0.333	0.231	0.25	0.063	0.053	0.083	0.05	0.053	0
7	*	*	*	*	*	*	1	0.25	0.333	0.2	0.231	0.083	0.067	0.125	0.063	0.067	0
8	*	*	*	*	*	*	*	0.25	0.333	0.2	0.231	0.083	0.067	0.125	0.063	0.067	0
9	*	*	*	*	*	*	*	*	0.778	0.778	0.538	0.133	0.111	0.182	0.105	0.111	0
10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.8	0.467	0.118	0.1	0.154	0.095	0.1	0.043
11	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.571	0.118	0.1	0.154	0.095	0.1	0.043
12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.15	0.13	0.118	0.125	0.083	0.077
C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.438	0.333	0.263	0.353	0.19
D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.462	0.5	0.444	0.273
E	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.429	0.357	0.167
F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.5	0.318
G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.4
H	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Tabla 15. Valores del Índice de Sorensen- Dice

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C	D	E	F	G	H
1	0.706	0.2	0.2	0.364	0.667	0.364	0.364	0.667	0.706	0.588	0.571	0	0	0	0	0	0
2*		0.182	0.182	0.333	0.625	0.333	0.333	0.625	0.778	0.667	0.727	0.105	0.091	0	0.087	0	0.167
3*	*		1	0.8	0.444	0.8	0.8	0.444	0.364	0.364	0.267	0.167	0.133	0.25	0.125	0.133	0
4*	*	*		0.8	0.444	0.8	0.8	0.444	0.364	0.364	0.267	0.167	0.133	0.25	0.125	0.133	0
5*	*	*	*		0.6	1	1	0.4	0.5	0.333	0.375	0.154	0.125	0.222	0.118	0.125	0
6*	*	*	*	*		0.6	0.6	0.429	0.5	0.375	0.4	0.118	0.1	0.154	0.095	0.1	0
7*	*	*	*	*	*		1	0.4	0.5	0.333	0.375	0.154	0.125	0.222	0.118	0.125	0
8*	*	*	*	*	*	*		0.4	0.5	0.333	0.375	0.154	0.125	0.222	0.118	0.125	0
9*	*	*	*	*	*	*	*		0.875	0.875	0.7	0.235	0.2	0.308	0.19	0.2	0
10*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.889	0.636	0.211	0.182	0.267	0.174	0.182	0.083
11*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.727	0.211	0.182	0.267	0.174	0.182	0.083
12*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.261	0.231	0.211	0.222	0.154	0.143
C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.609	0.5	0.417	0.522	0.32
D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.632	0.667	0.615	0.429
E	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.6	0.526	0.286
F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.667	0.483
G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		0.571
H	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

Como en el caso de los amplicones obtenidos con los cebadores de la región V3 del ADN<sub>r</sub>, en los dos índices de observa una correlación en cuanto a sus valores, ya que también presentan el valor más alto (comparación carril 4 y 3, 5 y 7, 8 y 5, 8 y 7,) y más bajo (comparación carril 1 y C, D, E, F, G, H) para los mismos casos.

Una vez calculados los índices se procedió a la construcción del dendrograma, utilizando el método de UPGMA. El dendrograma fue obtenido de la misma forma que el anterior, mediante la utilización del programa DendroUPGMA. (<http://genomes.urv.es/UPGMA/>)

En la figura 41 se presenta el dendrograma obtenido

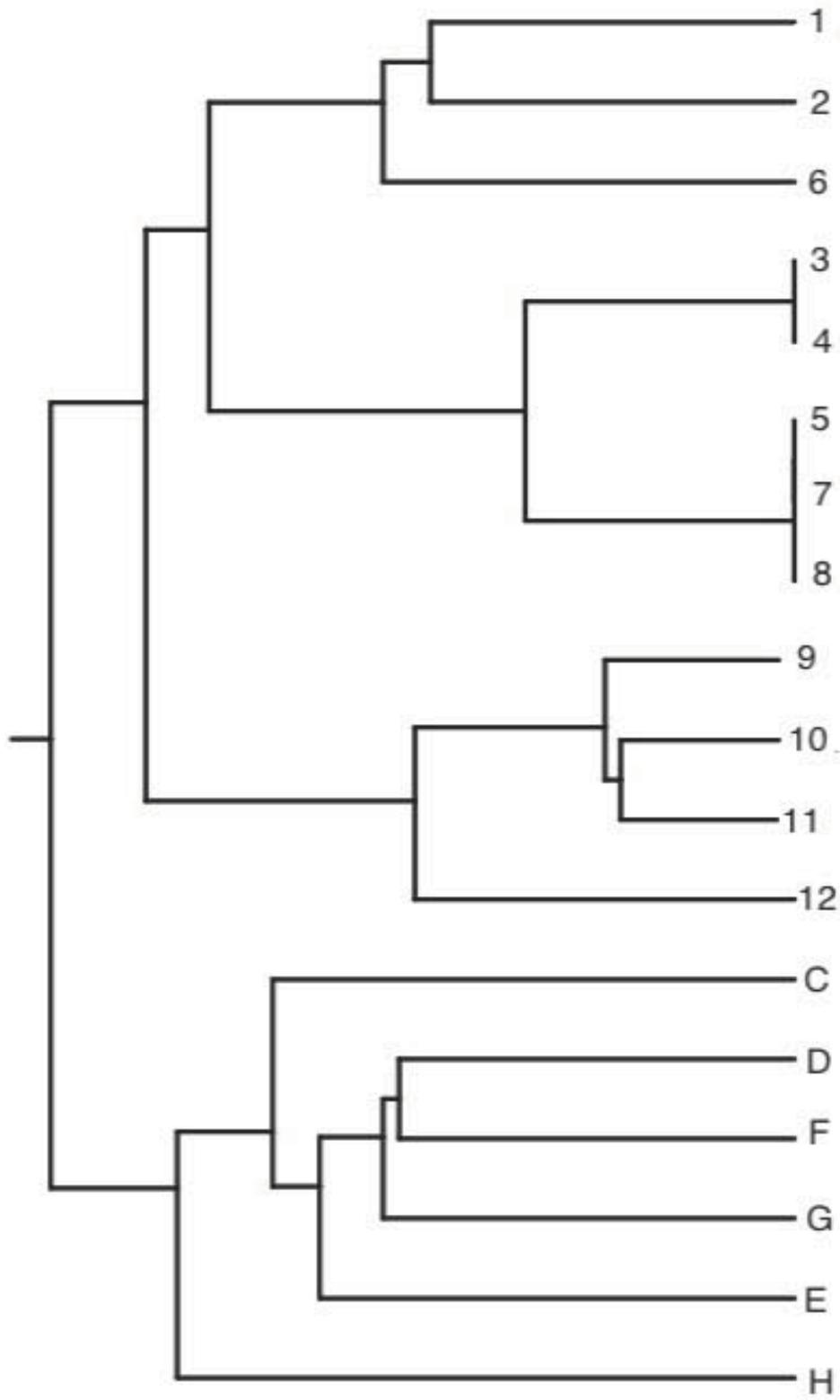


Figura 41. Dendrograma para las muestras de Queso Cotija de acuerdo a los amplicones obtenidos del gen *rpoB*. Numeros: muestras de Jalisco. Letras: muestras de Chiapas

Como en el caso del dendrograma para la región V3 del ADN<sub>r</sub>, se puede observar en éste una diferenciación entre las muestras provenientes de Jalmich (números) y las muestras provenientes de Chiapas (letras). El dendrograma muestra nuevamente 2 grupos muy bien definidos donde en el primero se agrupan todas las muestras provenientes de la Sierra de Jalmich, mientras que en el otro grupo se agrupan todas las muestras provenientes de Tonalá y sus alrededores.

Este resultado, aunado al proveniente del obtenido en el estudio con los cebadores para la región V3 del ADN<sub>r</sub>, nos confirma que las muestras provenientes de Jalmich y Chiapas son diferentes en cuanto a su población microbiana.

Del mismo modo al término del análisis del patrón de bandeo, se procedió a la elección de las bandas para secuenciar. Esta selección se realizó mediante la ayuda de los programas Diversity Database 2.2 y GelDoc de BioRad. Se seleccionaron las bandas que tuvieran una mayor definición, que pudieran ser predominantes en la mayoría de los carriles y bandas representativas de los dos grupos de muestras diferentes.

Se seleccionaron 16 bandas que en la figura 42 se remarcan con color rojo en el patrón digital de bandeo.

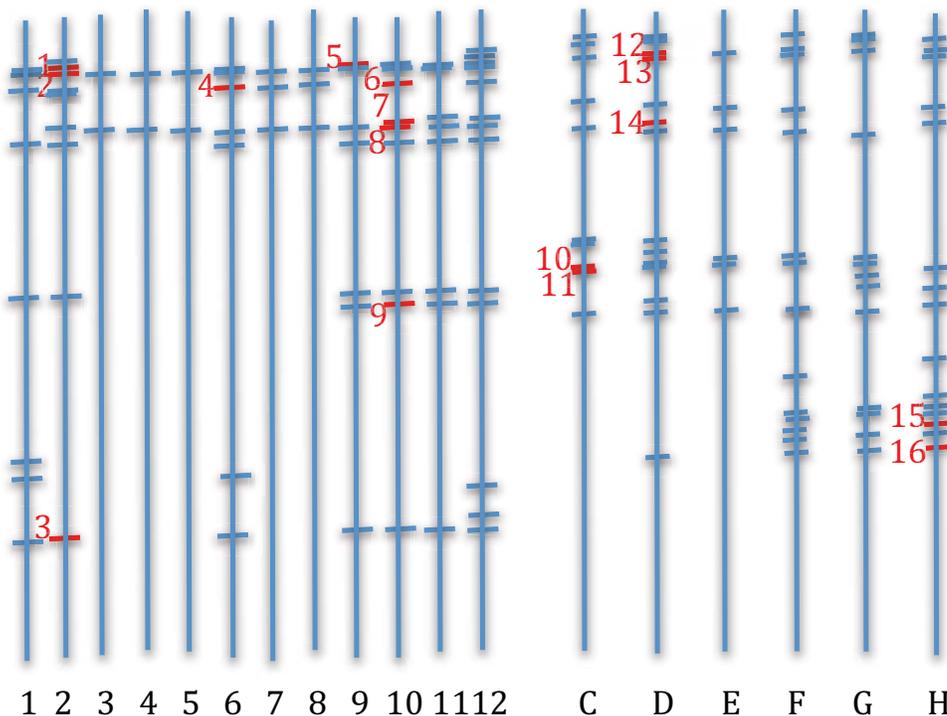


Figura 42. Patrón digital de bandas obtenidas con los cebadores para el gen *rpoB* con bandas en rojo seleccionadas para secuenciar. Numeros: muestras de Jalmich. Letras: muestras de Chiapas

En la tabla 16 se presentan los resultados de los microorganismos con los que presentan una mayor identidad las bandas seleccionadas.

Tabla 16. Microorganismos encontrados en las bandas mandadas a secuenciar de los cebadores de *rpoB*

Carril	No. De banda	Identidad	%ID
2	1	<i>Staphylococcus equorum</i>	84
2	2	<i>Staphylococcus equorum</i>	86
2	3	<i>Streptococcus infantarius</i>	96
6	4	<i>Staphylococcus equorum</i>	84
9	5	<i>Staphylococcus equorum</i>	88
10	6	<i>Staphylococcus equorum</i>	84
10	7	<i>Staphylococcus equorum</i>	85
10	8	<i>Enterococcus faecium</i>	99
10	9	<i>Streptococcus infantarius</i>	98
C	10	<i>Streptococcus infantarius</i>	99
C	11	<i>Streptococcus infantarius</i>	100
D	12	<i>Streptococcus suis</i>	94
D	13	<i>Streptococcus suis</i>	97
H	15	<i>Streptococcus suis</i>	97
H	16	<i>Streptococcus suis</i>	96

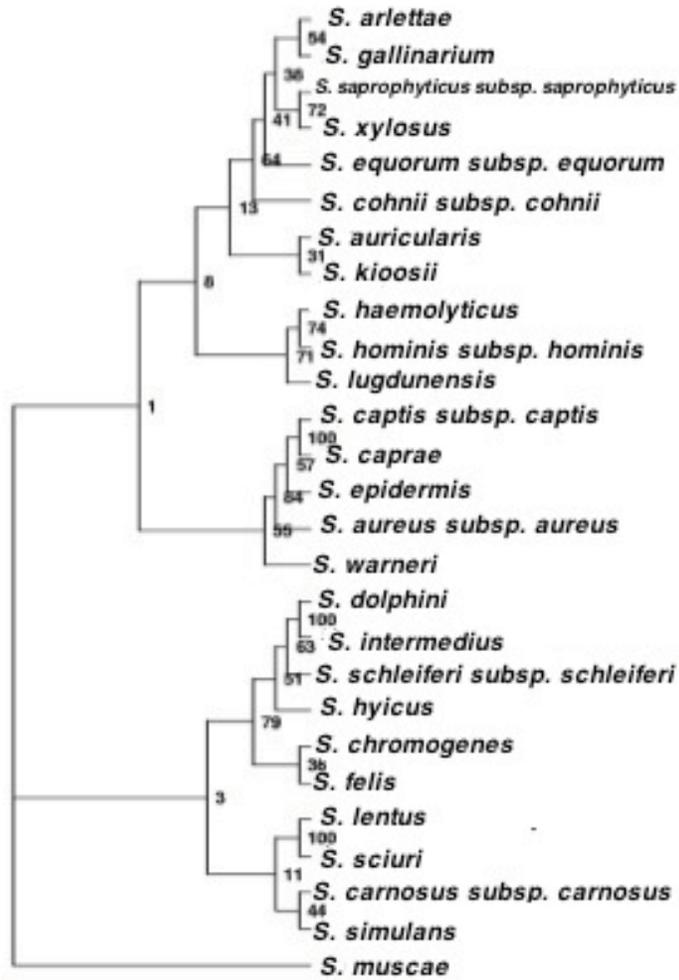
Al hacer la comparación entre géneros encontrados utilizando el 16S y *rpoB* como genes blanco en los geles de DGGE, se ha observado que generalmente cuando se usa *rpoB* se encuentran menos bandas en los carriles, pero se encuentran nuevos géneros que al usar sólo el 16S no se habían catalogado antes (Dahllof *et al* 2000, Martin-Platero *et al* 2009, Renouf *et al* 2006). Esto puede ser la explicación de que en este caso se encontraron nuevos géneros y especies no vistos antes en el grupo de trabajo. De las 16 bandas, solamente una de las bandas no pudo ser identificada, por baja confiabilidad.

El gen *rpoB*, como blanco a utilizar para la identificación de microorganismos, no había sido utilizado previamente por el grupo de trabajo y al hacer el estudio se presentaron algunos problemas. Dado que el gen *rpoB* no ha sido estudiado tanto como la región V3 del 16S del ADNr, no se tienen tantas secuencias completas o identificadas de muchas especies de microorganismos, por lo que es difícil hacer una identificación completamente confiable. Además la base de datos (al ser relativamente nueva) cambia constantemente, por lo que surgió el problema de que en un principio se había identificado otro microorganismo (*Streptococcus parasanguinis*), pero después de un mes al volver a escribir la secuencia en la base de datos el resultado fue diferente. Existen ciertos problemas inherentes al uso de un nuevo gen blanco, por lo cual se debe de tener cuidado al presentar resultado

Se puede observar la presencia de *Enterococcus faecium* en una banda seleccionada de un queso de Jalmich, la cual está presente en todas las muestras de queso analizado. Hay que remarcar que el género *Enterococcus* es un género predominante en la comunidad microbiana del queso Cotija. Se han encontrado a

las especies de *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. termitis* y *E. asini* (Gómez Castelo, 2009). Dicho género se diferencia por ser un coco Gram positivo, catalasa negativo que es capaz de crecer en un rango de temperatura que va de 10 a 45°C, a altas concentraciones de NaCl (6.5%) y pH tanto básico como ácido. Ha sido aislado del tracto intestinal de animales y humanos, además de estar presente en algunos tipos de carne y quesos (la mayoría elaborados con leche cruda). La especie *Enterococcus faecium* es capaz de producir bacteriocinas y además se ha utilizado como probiótico (Franz *et al* 1999). Es una bacteria ácido láctica que dentro del grupo de trabajo se ha confirmado contribuye a la acción lipolítica y proteolítica en el producto final (Zúñiga 2009). Aunque el género ha sido vinculado a enfermedades nosocomiales y llega a ser considerado como patógeno oportunista (Franz *et al* 1999), recientemente se observó que cepas aisladas del queso Cotija no presentaban los genes que codifican para citolisina (factor de virulencia de daño a tejido), además de que dichas cepas mostraban actividad antibacteriana frente a *M. lysodeikticus*, *E. coli* y *S. aureus* (Olvera, comunicación personal). Con estos resultados se confirma el importante papel del género *Enterococcus* en la no proliferación de microorganismos patógenos dentro del queso.

Por otra parte, un microorganismo no encontrado anteriormente en el grupo de trabajo y presente en una gran cantidad de quesos es el *Staphylococcus equorum*, el cual se presenta como banda sólo en los quesos provenientes de la Sierra de Jalmich, en las zonas de baja concentración de agentes desnaturalizantes en el gel de DGGE. Este microorganismo ha podido ser aislado de piel de caballo y en algunos casos en la fermentación de salchichas y queso suizo de las montañas (Nováková *et al.* 2006). Es un coco Gram positivo, catalasa negativo que se cree llega a ser encontrado en estos ambientes debido a su tolerancia a altas concentraciones de sal y a pH ácidos (Hoppe- Seyler *et al.* 2004). Esta especie puede producir ácido a partir de lactosa, por lo que su presencia en los quesos llega a ser justificada (Place R. *et al.* 2003). Además se ha encontrado que está muy relacionado filogenéticamente con *Staphylococcus saprophyticus*, *S. xylosus* y *S. gallinarium* a nivel de especie utilizando como marco de comparación tanto al gen *rpoB* como al gen 16S de ADNr (Ghebremedhin *et al*, 2007), los cuales sí han sido reportados en quesos madurados de la región de Cotija. En las figuras 43 y 44 se presentan los árboles filogenéticos. Como se puede ver en las figuras, la especie *Staphylococcus equorum* puede ser ubicada filogenéticamente



### 16S rRNA

Figura 43. Árbol filogenético basado en la secuencia del 16S ADNr para las distintas especies del género *Staphylococcus*

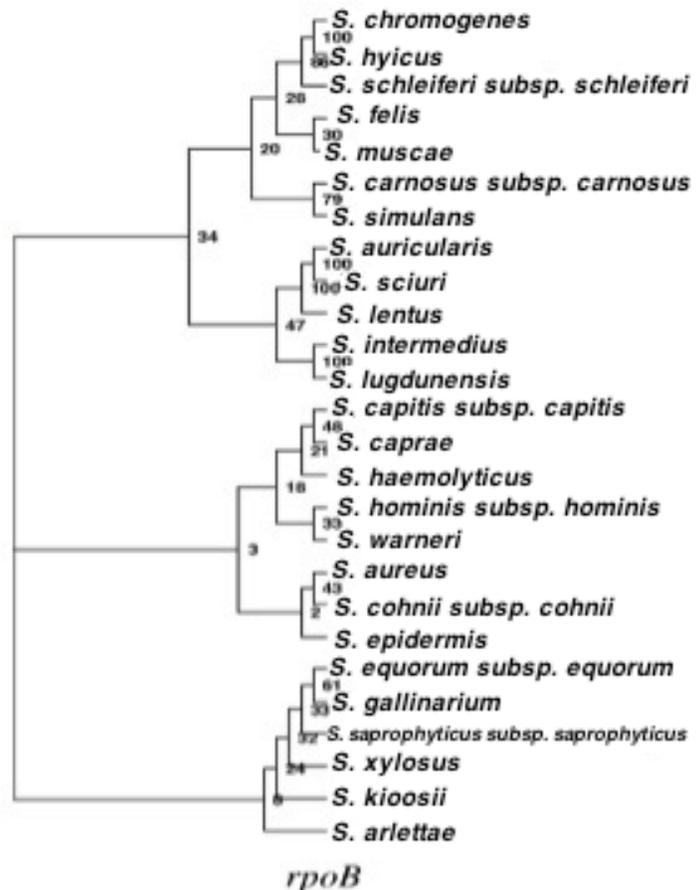


Figura 44. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen *rpoB* para las distintas especies del género *Staphylococcus*

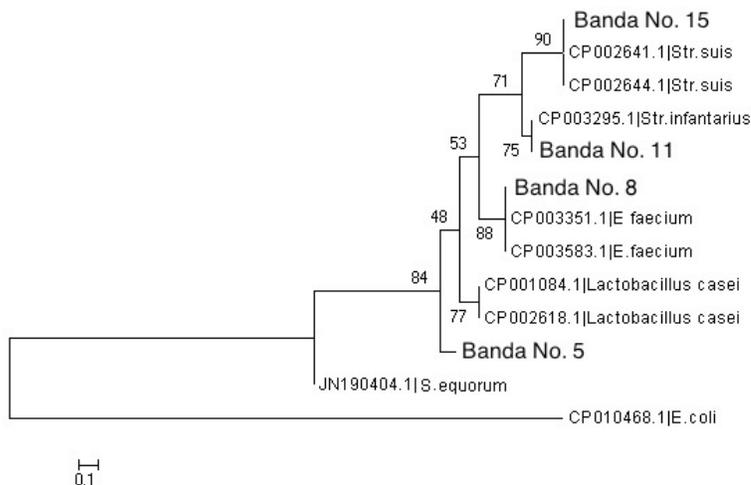
Hay que insistir que aunque dicha especie no había sido identificada previamente, el género *Staphylococcus* sí se había encontrado en el queso dentro del grupo de trabajo (García Saturnino *et al*, 2010). Se ha identificado por la PCR a *Staphylococcus aureus*, el cual es considerado un patógeno peligroso, además de *Staphylococcus pasteurii*, *S. piscifermentans*, *S. xylosus* y *S. saprophyticus*. El género *Staphylococcus* se caracteriza por la producción de lipasas, y se ha reportado que su inoculación en alimentos se da por el manejo humano. Dicho lo cual se podría erradicar su presencia en el queso teniendo buenas prácticas de manejo del alimento.

Se logró identificar a *Streptococcus infantarius*, el cual es un coco Gram positivo catalasa negativo, que se ha podido identificar en quesos madurados provenientes de África y Europa (Jans *et al* 2012) así como en pozol aquí en México (Wacher y Díaz 2003). Esta especie puede llegar a producir ácido a partir de lactosa (Abdelgadir *et al*. 2008). Es considerada como potencialmente patógena para el ser humano, causante de endocarditis (Jans *et al* 2012) y cáncer en el tracto digestivo (Corredoira *et al*. 2008). En el caso de esta especie parece encontrarse en las dos regiones productoras que se estudian en este proyecto.

Por último sólo en la zona de Chiapas se logró identificar a *Streptococcus suis*, el cual es un coco Gram positivo, capaz de tolerar un rango de pH que va de 4 a 10

(Wu *et al.* 2011). Este coco ha sido aislado de cerdos y de carne de cerdo cruda (Cheung *et al.* 2008) y también en una bebida fermentada de maíz en México (Escalante *et al.* 2001). Puede llegar a causar infecciones en humanos y cerdos tales como meningitis, septicemia, endocarditis, artritis y choque séptico (Wu *et al.* 2011). Por estas causas se podría especular que la contaminación del producto con dicha especie puede ser causada por la manipulación del queso y la leche de la vaca en el ambiente de la granja, por lo que se debería tener un especial cuidado sobretodo con respecto al manejo de los porcinos.

Se realizó el análisis filogenético para las secuencias provenientes de la amplificación del gen *rpoB*, usando algunas bandas seleccionadas de los geles de electroforesis en gel por gradiente desnaturante. Ya que el gen mencionado codifica para la ARN polimerasa, se decidió construir el árbol a partir de la secuencia de aminoácidos. Esta se obtuvo a partir de la secuencia de nucleótidos y usando el correcto marco de lectura. Se usó el método de Neighbor- Joining usando el programa MEGA. Se analizaron un total de 13 secuencias: 4 provenientes de bandas y 9 obtenidas del GenBank. La inferencia filogenética de las bandas 5, 8, 11 y 15 por un análisis de Bootstrap con 1000 remuestreos, el cual se presenta en la Figura 45. En este árbol consenso se colocó a la banda número 15 (*Streptococcus suis*) en el grupo de la especie *Streptococcus suis*, por lo que se puede decir que la identificación es satisfactoria. Para el caso de la banda número 11 (*Streptococcus infantarius*) se coloca a la par de la especie *Streptococcus infantarius* proveniente del GenBank por lo que de igual manera la identificación es correcta. Esta situación sucede de igual manera para la banda número 8 (*Enterococcus faecium*), la cual de igual forma se colocó con las secuencias para *Enterococcus faecium* por lo que la identificación es confiable. En el caso de la banda número 5 (*Staphylococcus equorum*) se encuentra cercana al grupo del género *Staphylococcus*, pero también al de *Lactobacillus casei* por lo que en este caso no se podría afirmar que hubo una correcta identificación del género, lo que puede ser debido a los problemas ya mencionados sobre las bases de datos que contienen las secuencias de *rpoB*.



**Figura 45.** Relación filogenética de las bacterias identificadas por la secuenciación de bandas del gen *rpoB* inferida usando el método de Neighbor-Joining (Saitou N y Nei, 1987). El árbol consenso inferido de entre 1,000 remuestreos representa la relación entre las 28 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 durante el análisis por bootstrap con 1,000 remuestreos (Felsenstein, 1985). La distancia de la relación se calculó usando el método de Jones Taylor Thornton (Jones, Taylor, Thornton, 1992). Todas las posiciones que contenían gaps fueron eliminadas del grupo de secuencias analizadas. El análisis se realizó empleando el programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

Por último se recordará que con los amplicones de *rpoB* aunado al DGGE se llegan a identificar microorganismos que no se encuentran con cebadores universales para la región de V3. Esto es debido a que ofrece una mayor identificación a nivel de especies que el gen 16S de ADNr, ya que los genes que codifican para proteínas comparados contra los genes ribosomales llegan a mostrar una mayor resolución (Vos *et al.* 2012).

En cuanto a bandas identificadas como la misma especie, pero con distintas condiciones desnaturalizantes, se podría deber en su mayoría a amplificaciones incompletas en la reacción en cadena de la polimerasa y en menor parte a una posible mutación del gen *rpoB*. Dichas mutaciones se han observado únicamente en la especie *Mycobacterium tuberculosis* (Hwang *et al.* 2003).

En general se puede concluir que la utilización de la región V3 del ADNr y el gen *rpoB* para la identificación de la microbiota de estudio fue de mucha utilidad y confiabilidad, ya que junto con la aplicación de métodos de inferencia filogenética, se puede obtener una identidad más precisa.

## Conclusiones

Existen diferencias significativas entre la región de la Sierra de Jalmich y la región de Chiapas en el proceso de manufactura utilizado, entre las que destacan el tipo de leche que se utiliza, tipo de sal utilizada, cuajo y, en especial, el tiempo de maduración del producto final.

Se pueden distinguir claramente dos grupos de quesos en relación a las propiedades fisicoquímicas, validadas en términos estadísticos y correspondientes a las dos regiones (salvo una muestra proveniente de Chiapas). Las diferencias corresponden a la información de los procesos de manufactura.

La composición de macrocomponentes permite agrupar las muestras en grupos que diferencian a las dos zonas. Los datos de las dos regiones son resultado de los procesos de elaboración y del ambiente donde se desarrollan.

La amplificación de la región V3 del 16S del ADNr y su posterior electroforesis en gel por gradiente desnaturante y tras la secuenciación de bandas seleccionadas, permitió identificar a microorganismos dominantes en las dos regiones. Estos fueron *Bacillus sp*, *Virgibacillus pantothenicus*, *Bacillus vietnamensis* y *Vagococcus sp*. Los patrones de bandeo de las dos regiones fueron diferentes estadísticamente hablando, pero no se pudieron diferenciar de acuerdo a los microorganismos encontrados las zonas geográficas de origen.

Cuando se usó como gen blanco a *rpoB* se logró una diferenciación de las dos zonas por patrón de bandeo en DGGE. Además, se logró identificar a la población dominante de las dos zonas. Se observó que *Enterococcus faecium* y *Streptococcus infantarius* se presentaban en las dos regiones, mientras que *Staphylococcus equorum* solamente en la región de la Sierra de Jalmich y *Streptococcus suis* en la región de Chiapas. Pese a las limitaciones por microheterogeneidad del gen 16S del ADNr en su uso en DGGE, la utilización de éste, aunado al empleo de otro gen blanco (en este caso *rpoB*) brindan una amplia y más completa información filogenética en cuanto a poblaciones microbianas.

Tras las comparaciones realizadas se puede aseverar que el queso denominado como Queso Cotija región de origen (proveniente de la Sierra de Jalmich) es diferente del producido en Chiapas y sus alrededores.

### **Perspectivas del proyecto global**

- Realizar un estudio de secuenciación masiva utilizando como gen blanco a *rpoB*.
- Una vez identificados los géneros, encontrar los medios adecuados para realizar un aislamiento.
- Del mismo modo, conociendo los microorganismos presentes se pueden diseñar sondas específicas para conocer la proporción de estos presentes en el queso.

## **Anexo**

### **A. Recuperación del paquete celular a partir del queso**

Las muestras de queso Cotija fueron descongeladas y puestas en refrigeración a 4 °C por no más de 18 h previo a su utilización según lo establecido en la norma NOM-110-SSA1-1994.

Posteriormente se empleó el siguiente procedimiento experimental:

- 1- Se pesó en la campana de flujo laminar 15 g de cada una de las muestras dentro de bolsas para Stomacher (Seward).
- 2- Se adicionó a cada muestra 50 mL de citrato de sodio al 2%, pH 8.
- 3- Se homogenizó durante 2 min a alta velocidad dentro del Stomacher, para llevar a cabo una ruptura mecánica de la matriz del queso.
- 4- Se adicionó 1 mL de solución de neutrasas (Novo Nordisk) dentro de la campana de flujo laminar, con el fin de romper la red proteínica del queso.
- 5- Se mezcló a alta velocidad dentro del Stomacher durante 1 min.
- 6- Se incubó durante 1 h a 100 rpm y 45 °C.
- 7- Posteriormente se dividió la mezcla en 2 tubos estériles para centrifuga de 50 mL (Falcon).
- 8- Se centrifugó a 3500 rpm durante 7 min a 4 °C para lograr separar las fracciones de proteína y grasa de las células de los microorganismos presentes en el queso.
- 9- Se transfirió la fase intermedia, la cual contiene las células de los microorganismos, a un tubo de 50 mL estéril con ayuda de una micropipeta de 5 mL.
- 10- Se centrifugó a 8500 rpm/5 min/ 4 °C.
- 11- Se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet 3 veces con solución salina 0.85% pH 7, se centrifugó en cada ocasión en las condiciones descritas en el punto anterior
- 12- Se resuspendió el pellet en 1 mL de solución salina 0.85% pH 7, se transfirió a un tubo de 2 mL (eppendorf).
13. Se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante.

**Nota:** Los paquetes celulares se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Este procedimiento se realizó por duplicado.

## **B. Extracción ADN (Kit Fast ID).**

1. Premezclar en un tubo de 2 mL, 10  $\mu$ L de proteinasa K (10 mg/mL), 1 mL de solución de lisis y lisozima, agitar vigorosamente.
2. Adicionar la mezcla al pellet, agitar vigorosamente.
3. Incubar a 65 °C/600 rpm/ 30 min (Thermomixer, eppendorf).
4. Dividir la muestra en 2 tubos eppendorf de 500  $\mu$ L.
5. Dentro de la campana añadir cloroformo en relación 1:1.
6. Agitar vigorosamente, centrifugar a 10000 rpm/5 min en una microcentrífuga (eppendorf).
7. Con ayuda de una micropipeta transferir la fase superior a un tubo de 2 mL. Añadir buffer de unión en relación 1:1. **Nota:** Si la muestra presenta turbidez, se centrifuga a 14000 rpm/5 min (Microcentífuga, eppendorf).
8. Transferir a una columna montada en un tubo de 2 mL, centrifugar a 14000 rpm/1 min.
9. Lavar la columna con 800  $\mu$ L de buffer de lavado, centrifugar a 14000 rpm/1 min.
10. Agregar 800  $\mu$ L de Etanol al 75% (por triplicado), centrifugando a 14000 rpm/1 min en cada ocasión.
11. Secar la columna centrifugando en las mismas condiciones, desechar el tubo y colocar la columna sobre un tubo de 1.5 mL.
12. Adicionar 50  $\mu$ L de buffer de elusión (1X TE) previamente calentado a 65 °C/10 min.
13. Centrifugar a 14000 rpm/1 min, desechar la columna, conservar a -20 °C hasta su utilización.

## **All. Soluciones para DGGE.**

**Tabla All.** Composición de las soluciones desnaturalizantes para gel al 6% utilizadas.

<b>Reactivo</b>	<b>20%</b>	<b>30%</b>	<b>60%</b>	<b>70%</b>
Acrilamida 40%	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL
Buffer TAE 50X	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Urea (g)	8.4	12.6	25.2	29.4
Formamida (mL)	8	12	24	28
dH <sub>2</sub> O	cbp 100 mL			

Composición de las soluciones desnaturalizantes para gel al 10% utilizadas.

<b>Reactivo</b>	<b>20%</b>	<b>35%</b>	<b>65%</b>	<b>70%</b>
Acrilamida 40%	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL
Buffer TAE 50X	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Urea (g)	8.4	12.6	25.2	29.4
Formamida (mL)	8	12	24	28
dH <sub>2</sub> O	cbp 100 mL			

Desgasificar por 10-15 min. Filtrar a través de una membrana de 0.45  $\mu$ . Almacenar a 4 °C en frascos ámbar no más de 1 mes.

**Tabla AIII.** Solución de Persulfato de amonio (APS) 10%.

Reactivo	Cantidad
APS	0.1 g
dH <sub>2</sub> O	1 mL

Almacenar a -20 °C hasta por 1 semana. Agregar de 50-70 µL y 10 µL de TEMED a 20 mL de solución desnaturante (tiempo aproximado de polimerización 1 h).

**Tabla AIV.** Buffer de carga 2X.

Reactivo	Cantidad	Concentración final
2% Azul de bromofenol	0.25	0.05%
2% Cianol xilenol	0.25	0.05%
100% Glicerol	7.0	70%
dH <sub>2</sub> O	2.5	
Volumen final	10.0	

Almacenar a temperatura ambiente.

**Tabla AV.** DCode solución teñidora.

Reactivo	Cantidad
2% Azul de bromofenol	0.05 g
2% Cianol xilenol	0.05 g
TAE Buffer	10.0 mL
Volumen final	10.0

Almacenar a temperatura ambiente.

**Tabla AVI.** Buffer TAE 1X.

Reactivo	Cantidad
Buffer TAE 50X	140 mL
dH <sub>2</sub> O	6860 mL
Volumen final	7000 mL

Reutilizar hasta 2 ó 3 veces.

### 3. Tinción de plata (Analytical Biochemistry 2009, 35, pp 174-175)

**Tabla AVIII.** Reactivos para tinción de plata.

<b>Reactivo</b>	<b>Componentes</b>	<b>Otros reactivos</b>
1. Solución teñidora	17.66 mL AGNO <sub>3</sub> al 0.1N 15 mL de etanol 0.75 mL de ácido acético glacial	116 mL de Agua desionizada
2. Solución reveladora	3% de NaOH 0.1% Formaldehído al 37%	150 mL de Agua desionizada
3. Solución de paro	15 mL de etanol 0.75 mL de ácido acético glacial	134 mL de agua desionizada

**Tabla AIX.** Procedimiento para la tinción de plata.

<b>Etapas del proceso</b>		<b>Procedimiento</b>	<b>Tiempo</b>
1	Tinción	Sumergir en solución teñidora y agitar. Lavar	20 min
5	Revelado	Sumergir en solución reveladora previamente calentada a 55°C y agitar	5- 10 min (hasta que intensidad requerida)
6	Paro y almacenamiento	Sumergir el gel en la solución de paro	1 min

#### 4. Valores para el análisis fisicoquímico

**Tabla AX.** Valores de  $a_w$ . Números: muestras de Jalmich. Letras: muestras de Chiapas

Muestra	aw (rep1)	aw (rep2)	aw (rep3)	Promedio	Desv. Est.
1	0.9	0.9	0.899	0.900	0.001
2	0.839	0.839	0.839	0.839	0.000
3	0.88	0.878	0.877	0.878	0.002
4	0.864	0.866	0.867	0.866	0.002
5	0.883	0.883	0.885	0.884	0.001
6	0.858	0.856	0.855	0.856	0.002
7	0.871	0.876	0.876	0.874	0.003
8	0.832	0.831	0.831	0.831	0.001
9	0.858	0.859	0.86	0.859	0.001
10	0.895	0.893	0.896	0.895	0.002
11	0.92	0.91	0.908	0.913	0.006
12	0.889	0.893	0.888	0.890	0.003
C	0.865	0.863	0.862	0.863	0.002
D	0.888	0.891	0.883	0.887	0.004
E	0.871	0.87	0.88	0.874	0.006
F	0.845	0.859	0.859	0.854	0.008
G	0.865	0.868	0.869	0.867	0.002
H	0.849	0.846	0.844	0.846	0.003

**Tabla AXI.** Valores de pH. Números: muestras de Jalmich. Letras: muestras de Chiapas

Muestra	pH (rep1)	pH (rep2)	pH (rep3)	Promedio	Desv. Est.
1	5.484	5.499	5.485	5.489	0.008
2	5.244	5.21	5.225	5.226	0.017
3	5.338	5.3	5.37	5.336	0.035
4	5.124	5.104	5.107	5.112	0.011
5	5.379	5.41	5.34	5.376	0.035
6	5.388	5.38	5.358	5.375	0.016
7	5.328	5.293	5.316	5.312	0.018
8	5.324	5.346	5.367	5.346	0.022
9	5.295	5.293	5.291	5.293	0.002
10	5.226	5.185	5.205	5.205	0.021
11	5.479	5.463	5.451	5.464	0.014
12	5.433	5.465	5.462	5.453	0.018
C	5.13	5.118	5.17	5.139	0.027
D	5.892	5.89	5.894	5.892	0.002
E	5.911	5.868	5.865	5.881	0.026
F	5.438	5.453	5.439	5.443	0.008
G	5.644	5.62	5.619	5.628	0.014
H	5.761	5.785	5.752	5.766	0.017

**Tabla AXII.** Valores de % cloruros. Números: muestras de Jalmich. Letras: muestras de Chiapas

Muestra	Peso	ml	% Cl	Peso	ml	% Cl	Peso	ml	% Cl	Promedio	Desv. Est.
1	9.99	9.6	2.782	10	10	2.896	9.98	10	2.902	2.860	1.431
2	10.01	15.4	4.471	10.03	14.8	4.287	10.05	14.3	4.133	4.297	2.153
3	10	10.1	2.925	9.99	10.1	2.928	10.05	10.2	2.940	2.931	1.465
4	10.03	11.7	3.383	10	11.8	3.422	9.99	13.3	3.865	3.557	1.792
5	9.98	11.1	3.224	10.03	10.5	3.033	10.02	11.2	3.240	3.166	1.586
6	10.01	12.3	3.565	10.03	13	3.762	10.07	12.6	3.631	3.653	1.828
7	9.99	13.9	4.041	10.06	14	4.042	10.06	13.7	3.954	4.012	2.006
8	10.03	12.3	3.558	10.01	12.6	3.653	10.07	12.6	3.631	3.614	1.807
9	10.02	14.2	4.116	10.01	15	4.354	10.02	15.2	4.408	4.293	2.150
10	10	12.2	3.539	10.01	12.6	3.653	9.99	12.4	3.601	3.598	1.799
11	9.99	11.2	3.250	10.01	10.6	3.068	10.04	10.6	3.059	3.126	1.565
12	10.06	11.2	3.227	10	10.3	2.984	10.05	12.3	3.551	3.254	1.643
C	10.02	14.4	4.174	10.02	14	4.058	10.03	13.3	3.849	4.027	2.018
D	10.03	18.2	5.278	10.01	17.1	4.968	9.98	17.7	5.158	5.135	2.571
E	10.03	17.7	5.133	10.07	17.8	5.141	10	17.4	5.060	5.111	2.556
F	10.08	20.5	5.920	10.02	19.8	5.751	9.99	20.3	5.914	5.862	2.932
G	10	19.8	5.762	9.96	19.8	5.785	10.01	20.2	5.873	5.807	2.904
H	10.03	25.6	7.436	10.03	25.7	7.466	10.08	25.6	7.400	7.434	3.717

**Tabla AXIII.** Valores de % acidez. Números: muestras de Jalmich. Letras: muestras de Chiapas

Muestra	Peso	ml	% acidez	Peso	ml	% acidez	Peso	ml	% acidez	Promedio	Desv. Est.
1	9.04	3.1	0.309	9.05	3.4	0.338	9	3	0.300	0.316	0.020
2	9.03	4.2	0.419	9.13	4.2	0.414	9.02	4.1	0.409	0.414	0.005
3	9.03	3.7	0.369	9.01	3.8	0.380	9.05	3.6	0.358	0.369	0.011
4	9.03	4.4	0.439	9.04	4.1	0.408	9.04	4.2	0.418	0.422	0.015
5	9.01	2.8	0.280	9.01	2.9	0.290	9.02	3	0.299	0.290	0.010
6	9.02	4.3	0.429	9.11	4.3	0.425	9.01	4.4	0.440	0.431	0.008
7	8.98	4	0.401	9.17	4	0.393	9.17	4	0.393	0.395	0.005
8	9.17	5	0.491	8.92	5	0.504	9.06	5	0.497	0.497	0.007
9	8.97	3.7	0.371	9.04	3.6	0.358	8.97	3.5	0.351	0.360	0.010
10	9.13	4.4	0.434	9.08	4.6	0.456	9.03	4.6	0.458	0.449	0.014
11	9.02	3	0.299	9.09	3.1	0.307	9.07	3	0.298	0.301	0.005
12	9.06	3.4	0.338	9.03	3.4	0.339	9.01	3.2	0.320	0.332	0.011
C	9.06	3.5	0.348	9.08	3.6	0.357	9.01	3.6	0.360	0.355	0.006
D	9.04	2.1	0.209	9.02	2.3	0.229	9.03	2.3	0.229	0.223	0.012
E	9.05	2.6	0.259	9.09	2.4	0.238	9.03	2.5	0.249	0.248	0.010
F	9.07	3.7	0.367	9.07	3.7	0.367	9.05	3.8	0.378	0.371	0.006
G	9.06	3.5	0.348	9.06	3.4	0.338	9.03	3.3	0.329	0.338	0.009
H	9.06	2.2	0.219	9.04	2.5	0.249	9.06	2.5	0.248	0.239	0.017

## 5. Métodos y valores del análisis proximal

### *Humedad- Método por secado en estufa de vacío (Nielsen, 2003)*

Se pesaron de 2 a 3 g de muestra en un pesafiltro con tapa (previamente pesado después de tenerlo a peso constante 2 hrs. a 130°C aprox.). Se secó la muestra al menos por 24 hrs. en la estufa conectada a vacío a una temperatura de 70°C como máximo. Se retiró de la estufa, se tapó y dejó enfriar en desecador y se pesó tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente. Se repitió la operación hasta peso constante.

Se calculó el porcentaje de humedad, reportándolo como pérdida por secado en estufa de vacío a  $70 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### *Cenizas*

#### *Método cenizas totales (calcinación) (Kirk et al, 1996)*

Se colocó a peso constante un crisol 2 hrs. aproximadamente en la mufla a 600°C.

Se pesaron de 3 a 5 g de muestra en el crisol (la muestra no debe sobrepasar la mitad del crisol) previamente pesado. Primeramente se calcinó la muestra, con un mechero en la campana hasta que no se desprendieron humos y posteriormente se metió a la mufla 2 hrs. cuidando que la temperatura no pasara de 550°C. Se repitió hasta conseguir unas cenizas blancas o ligeramente grises, homogéneas. Se enfrió en desecador y se pesó.

### *Proteína*

Se realizó mediante el método micro Kjeldahl. (Norma NMX-F-098-1976)

Se pesaron 0.2 gramos de la muestra y se colocaron en un tubo Kjeldahl junto con una pastilla digestora y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se sometió el tubo a la digestión (Digest- Kjeldahl) con una trampa de succión de gases hasta la digestión completa. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente, para después colocar el tubo en un destilador (destilador Kjeldahl), al que se le inyectó NaOH al 40% para liberar amoníaco, el cual se recibió en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de ácido bórico al 4% y 10 gotas de verde de bromocresol al 0.1%, hasta obtener un volumen aproximado de 100 mL, finalmente se tituló el nitrógeno amoniacal con ácido clorhídrico 0.1N y se registró el volumen gastado.

El nitrógeno total se calculó con la siguiente fórmula

$$\%N_{TOTAL} = \frac{(v_1 - v_2) \cdot A \cdot 0.014}{D}$$

Donde:  $v_1$  = volumen HCl gastado en muestra

$v_2$  = volumen HCl gastado en blanco

A = normalidad HCl

D = masa en gramos de la muestra

El porcentaje de proteína total se calcula con el factor de conversión para la leche y productos lácteos.

$$\%P_{TOTAL} = \%N_{TOTAL} \cdot 6.25$$

### Lípidos

Se realizó mediante el método Soxhlet

Se transfirieron 2.0 g de muestra finamente dividida en el cartucho o dedal; se cubrió con una porción de algodón.

Se colocó el cartucho dentro del extractor Soxhlet. En la parte inferior se ajustó un matraz con cuerpos de ebullición (llevados previamente a peso constante por calentamiento a 100 – 110°C). Se colocó el refrigerante.

Se añadió éter por el extremo superior del refrigerante en cantidad suficiente para tener 2 ó 3 descargas del extractor (alrededor de 80 mL).

Se hizo circular el agua por el refrigerante y se calentó hasta que se obtuvo una frecuencia de unas 2 gotas por segundo.

Se efectuó la extracción durante 4 a 6 horas. Se suspendió el calentamiento, se quitó el extractor del matraz y se dejó caer una gota de éter del extractor a un papel o vidrio de reloj.

Se evaporó suavemente el éter del matraz y se secó a 100°C hasta peso constante.

$$\text{Porcentaje de Extracto Etéreo} = P - p/M \times 100$$

Donde:

P = Masa en gramos del matraz con grasa

p = Masa en gramos del matraz sin grasa

M = Masa en gramos de la muestra.

**Tabla AXIV.** Valores de humedad, proteína, grasa y cenizas. Números: muestras de Jalmich. Letras: muestras de Chiapas

Muestra	Humedad	Desv. Est.	Proteína	Desv. Est.	Grasa	Desv. Est.	Cenizas	Desv. Est.
1	39.57	0.0000	21.411	0.0014	27.645	0.0354	5.845	0.0354
2	29.77	0.0000	26.42	0.0000	32.125	0.0354	6.665	0.0495
3	29.93	0.0000	26.53	0.0000	31.87	0.0990	6.735	0.0212
4	31.91	0.0000	23.585	0.0071	33.165	0.0636	6.62	0.0141
5	31.5	0.0000	22.66	0.0000	35.92	0.0707	6.03	0.0141
6	36.79	0.0000	22.46	0.0000	30.485	0.0495	5.81	0.0000
7	35.79	0.0000	23.14	0.0000	30.49	0.0141	5.92	0.0141
8	26.44	0.0000	27.16	0.0000	34.41	0.1980	6.44	0.0000
9	32.93	0.0000	22.285	0.0071	32.935	0.1768	7.005	0.0071
10	32.385	3.8113	23.885	0.0071	31.08	0.0424	7.165	0.2051
11	39.4	0.0000	21.73	0.0000	28.26	0.0283	5.675	0.0212
12	31.97	1.4001	23.92	0.0000	32.73	0.0000	6.54	0.0990
C	30.39	0.0000	18.09	0.0000	40.04	0.3536	6.29	0.0424
D	44.76	0.0000	19.91	0.0000	20.95	0.1980	8.52	0.0141
E	42.19	0.0000	21.75	0.0000	19.88	0.1131	8.69	0.0283
F	41.11	0.0000	20.02	0.0424	29.03	0.2121	8.625	0.0354
G	43.96	0.0000	19.815	0.0354	21.745	0.0636	8.745	0.0212
H	42.72	0.0000	17.84	0.0990	24.51	0.0707	8.72	0.0849

**Tabla AXV.** Valores de carbohidratos. Números: muestras de Jalmich. Letras: muestras de Chiapas

<b>Muestra</b>	<b>Carbohidratos (1)</b>	<b>Carbohidratos (2)</b>	<b>Carbohidratos (3)</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desv. Est</b>
1	0.163	0.176	0.202	0.180	0.020
2	0.131	0.165	0.153	0.150	0.017
3	0.055	0.077	0.093	0.075	0.019
4	0.271	0.261	0.27	0.267	0.006
5	0.283	0.205	0.238	0.242	0.039
6	0.138	0.161	0.245	0.181	0.056
7	0.184	0.209	0.208	0.200	0.014
8	0.06	0.069	0.072	0.067	0.006
9	0.223	0.176	0.156	0.185	0.034
10	0.152	0.153	0.179	0.161	0.015
11	0.239	0.153	0.16	0.184	0.048
12	0.098	0.066	0.099	0.088	0.019
C	0.165	0.154	0.142	0.154	0.012
D	1.092	1.223	1.213	1.176	0.073
E	1.102	0.882	1.026	1.003	0.112
F	0.375	0.383	0.376	0.378	0.004
G	0.616	0.644	0.648	0.636	0.017
H	1.161	1.251	1.208	1.207	0.045

## **6. Conceptos estadísticos**

### *Fisher LSD*

La prueba de Fisher de la menor diferencia significativa es un método de comparación múltiple creado en 1935 por Fisher y se desarrolla en dos etapas. En la primera se realiza una ANOVA y si la hipótesis nula es rechazada se puede realizar la prueba de Fisher. La segunda etapa consta de probar los contrastes individuales entre los grupos usando un nivel de confianza de 0.05%. Por esto se ha planteado que la prueba tiene un gran poder para detectar diferencias verdaderas. (Maxwell *et al*, 2004)

### *Método de Ward*

Ward en 1963 propuso un algoritmo para minimizar la pérdida asociada en cada agrupamiento y poder cuantificarla. En cada paso del análisis la unión de cada par para formar un grupo es considerada y los dos grupos cuyos resultados de fusión resulten en un mínimo incremento de “pérdida de información” son combinados (Narag Anurag, 2008). La pérdida de información está definida por Ward como error en la suma de cuadrados. Para medir la certeza de un grupo se usa la suma de cuadrados, y en cada paso todos los posibles agrupamientos son considerados y los grupos son formados utilizando la solución que brinde la menor suma de cuadrados “entre grupos” (Ajith Abraham, 2009).

### *UPGMA*

Es un algoritmo de agrupación jerárquico que produce un dendrograma a partir de una matriz de similitud. De acuerdo al aspecto a estudiar y a opinión del observador puede ser limitado a los grupos que se necesiten.

Cada caso comienza como su propio grupo, para posteriormente unirlos sucesivamente en orden a su “cercanía”. Esta cercanía está dada por la matriz de similitud (Ashis Sengupta, 2009).

## 7. Geles de DGGE previa purificación de amplicones

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Figura 42. Gel paralelo de los productos de PCR amplificados del gen V3 de la región de Jalmich. Gradiente de 35% a 65%  
80 V, 17 horas de corrida, 60°C

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Figura 43. Gel paralelo de los productos de PCR amplificados del gen *rpoB* de la región de Jalmich. Gradiente de 35% a 60%  
80 V, 17 horas de corrida, 60°C

C D E F G H

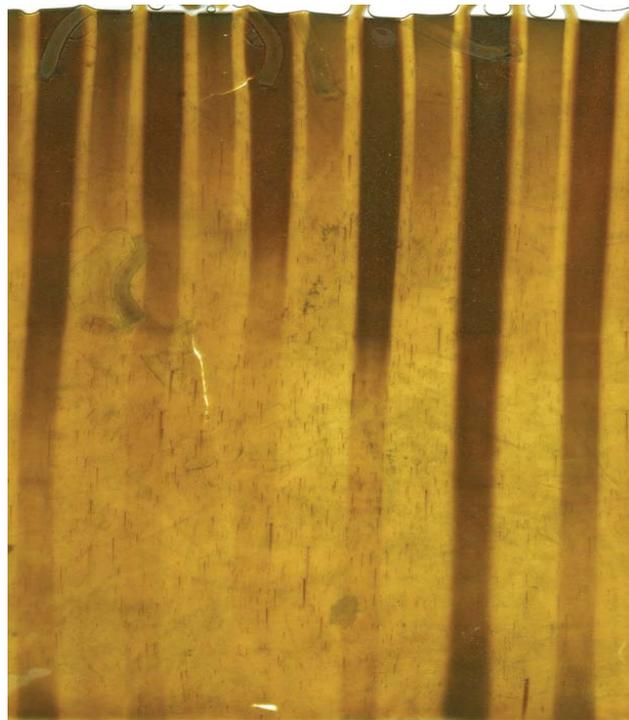
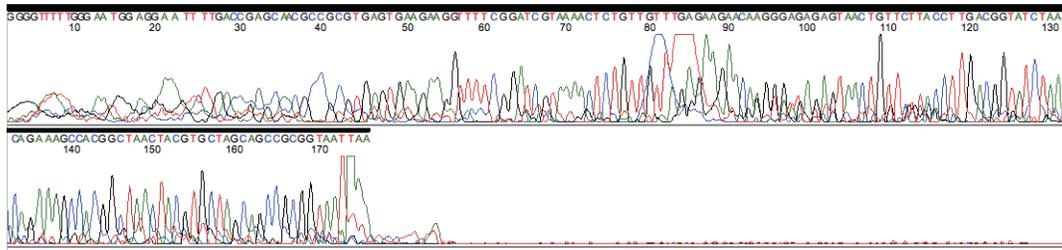


Figura 44. Gel paralelo de los productos de PCR amplificados del gen *rpoB* de la región de Chiapas. Gradiente de 30% a 60%  
80 V, 17 horas de corrida, 60°C

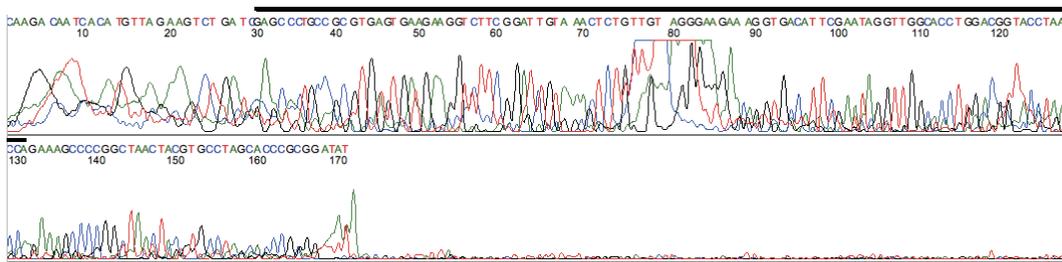
## 7. Secuencias de la región V3 del 16S del ADNr

### a) Banda 1



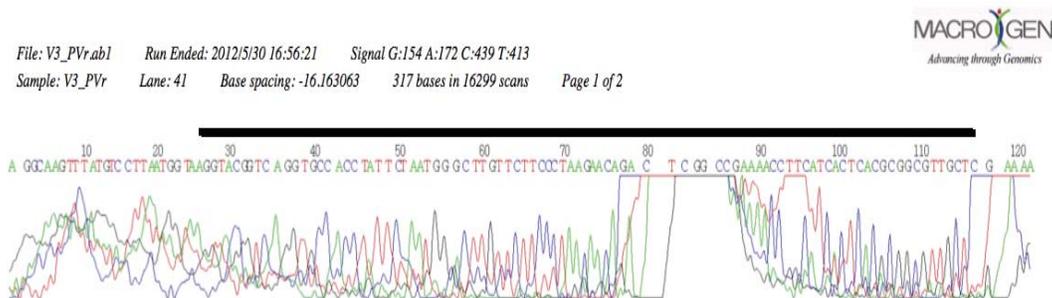
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra

### b) Banda 3



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra

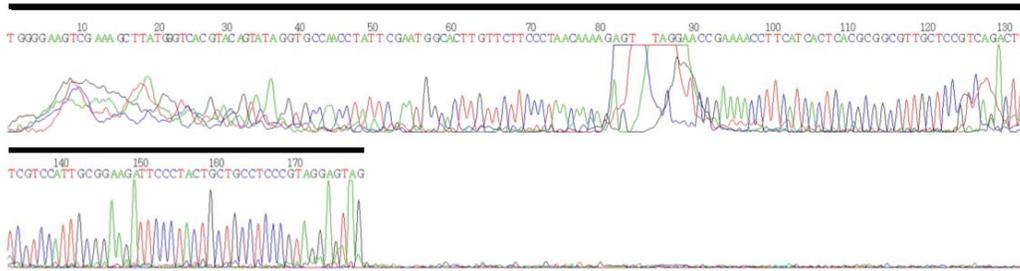
### c) Banda 4



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

### d) Banda 5

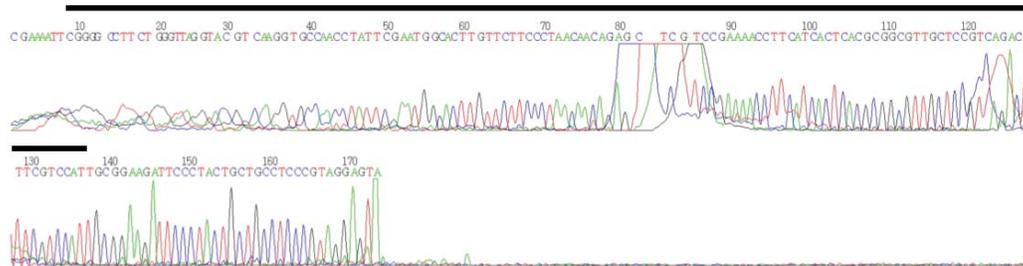
File: V16\_PVr.ab1 Run Ended: 2012/5/30 16:56:21 Signal G:219 A:242 C:385 T:355  
Sample: V16\_PVr Lane: 38 Base spacing: -16.163063 179 bases in 16198 scans Page 1 of 2



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

### e) Banda 6

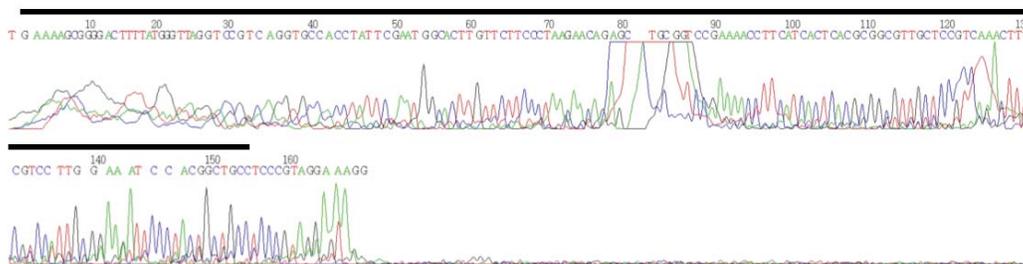
File: V6\_PVr.ab1 Run Ended: 2012/5/25 20:14:22 Signal G:157 A:201 C:373 T:320  
Sample: V6\_PVr Lane: 32 Base spacing: -16.163063 174 bases in 15938 scans Page 1 of 2



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

### f) Banda 7

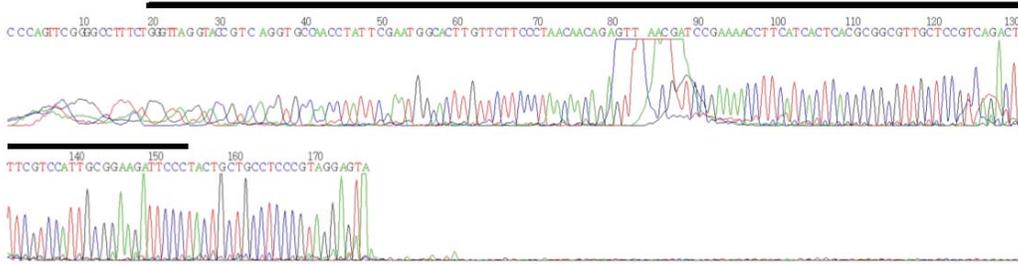
File: V15\_PVr.ab1 Run Ended: 2012/5/30 16:56:21 Signal G:259 A:291 C:585 T:470  
Sample: V15\_PVr Lane: 40 Base spacing: -16.163063 169 bases in 16186 scans Page 1 of 2



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

### g) Banda 9

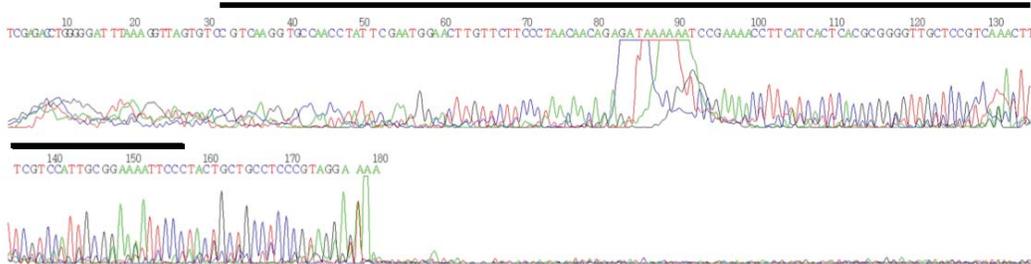
File: V8\_PVr.ab1 Run Ended: 2012/5/25 20:14:22 Signal G:289 A:297 C:482 T:395  
Sample: V8\_PVr Lane: 28 Base spacing: -16.163063 177 bases in 16002 scans Page 1 of 2



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

### h) Banda 10

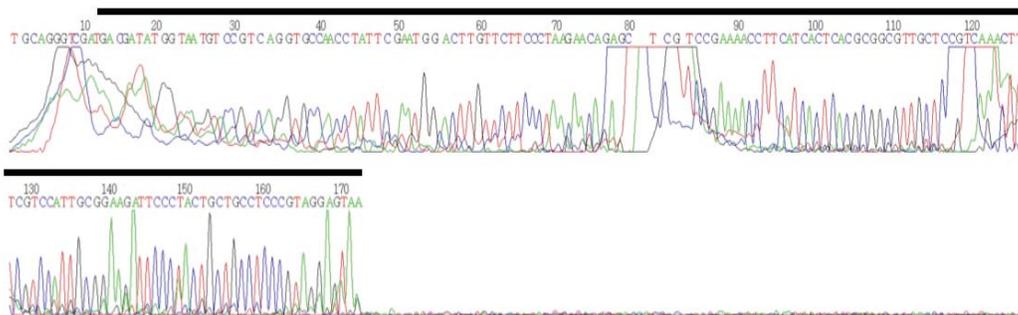
File: V10\_PVr.ab1 Run Ended: 2012/5/25 20:14:22 Signal G:65 A:77 C:112 T:102  
Sample: V10\_PVr Lane: 24 Base spacing: -16.163063 180 bases in 15970 scans Page 1 of 2



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

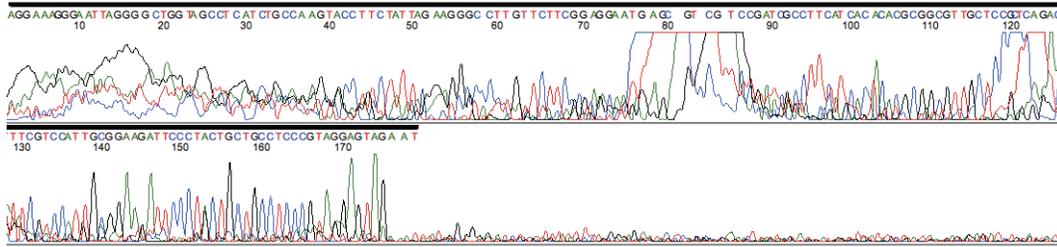
### i) Banda 11

File: V1\_PVr.ab1 Run Ended: 2012/5/30 16:56:21 Signal G:402 A:455 C:1023 T:968  
Sample: V1\_PVr Lane: 45 Base spacing: -16.163063 173 bases in 16190 scans Page 1 of 2



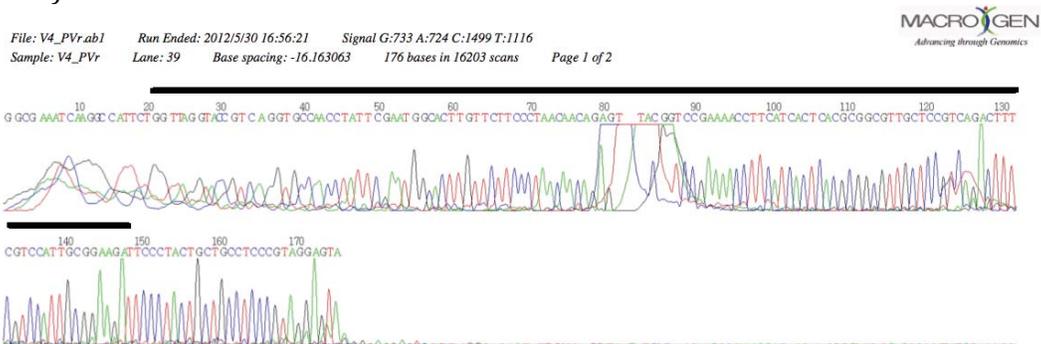
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

### j) Banda 12



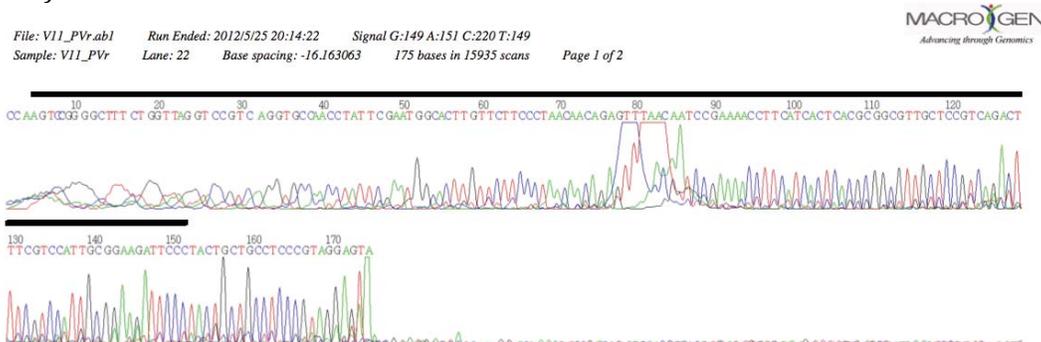
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra

### k) Banda 13



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

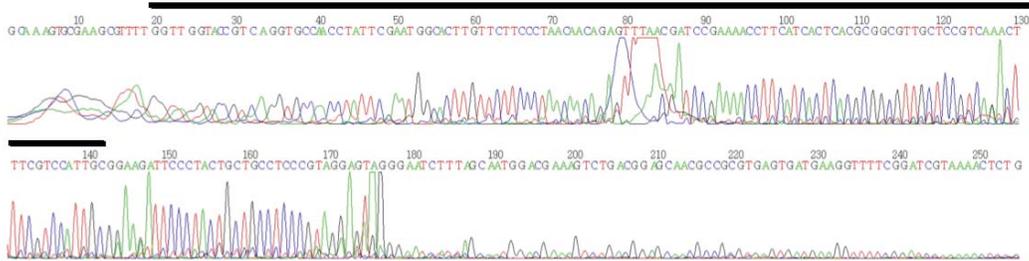
### l) Banda 14



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

### m) Banda 15

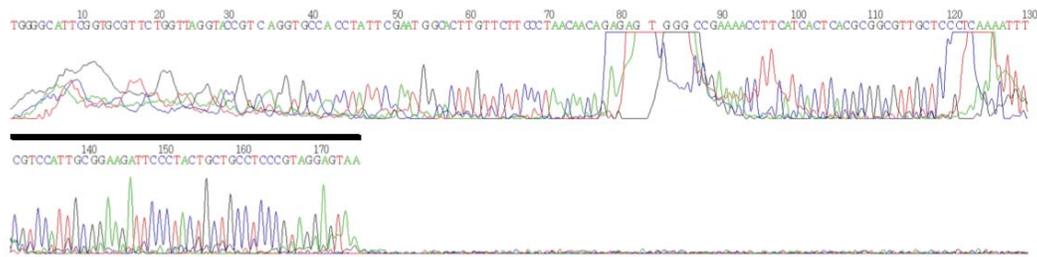
File: V5\_PVr.ab1 Run Ended: 2012/5/30 16:56:21 Signal G:621 A:615 C:725 T:502  
Sample: V5\_PVr Lane: 37 Base spacing: -16.163063 356 bases in 16161 scans Page 1 of 2



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

### n) Banda 16.1

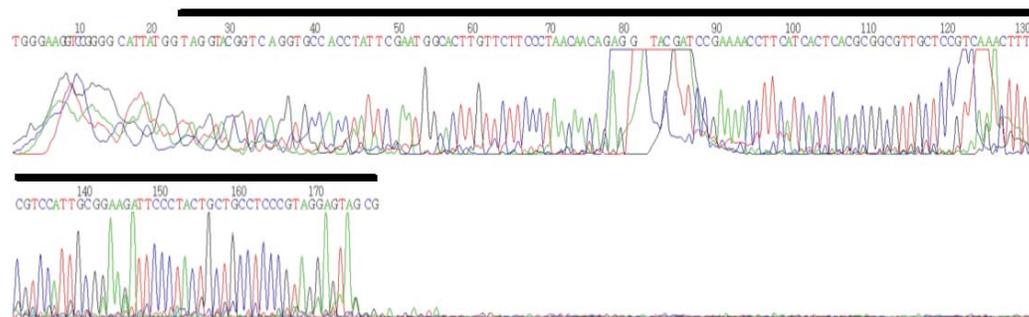
File: V13\_PVr.ab1 Run Ended: 2012/5/30 16:56:21 Signal G:209 A:249 C:615 T:587  
Sample: V13\_PVr Lane: 44 Base spacing: -16.163063 175 bases in 16219 scans Page 1 of 2



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

### o) Banda 16.2

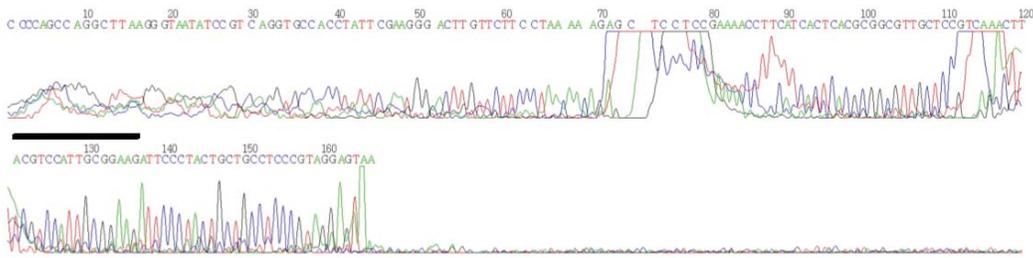
File: V2\_PVr.ab1 Run Ended: 2012/5/30 16:56:21 Signal G:524 A:511 C:1095 T:878  
Sample: V2\_PVr Lane: 43 Base spacing: -16.163063 178 bases in 16198 scans Page 1 of 2



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

p) Banda 17

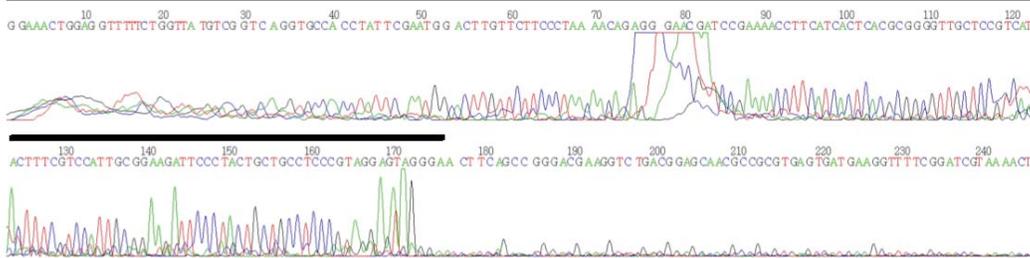
File: V7\_PVr.ab1 Run Ended: 2012/5/25 20:14:22 Signal G:125 A:180 C:400 T:442  
Sample: V7\_PVr Lane: 30 Base spacing: -16.163063 166 bases in 16005 scans Page 1 of 2



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

q) Banda 18

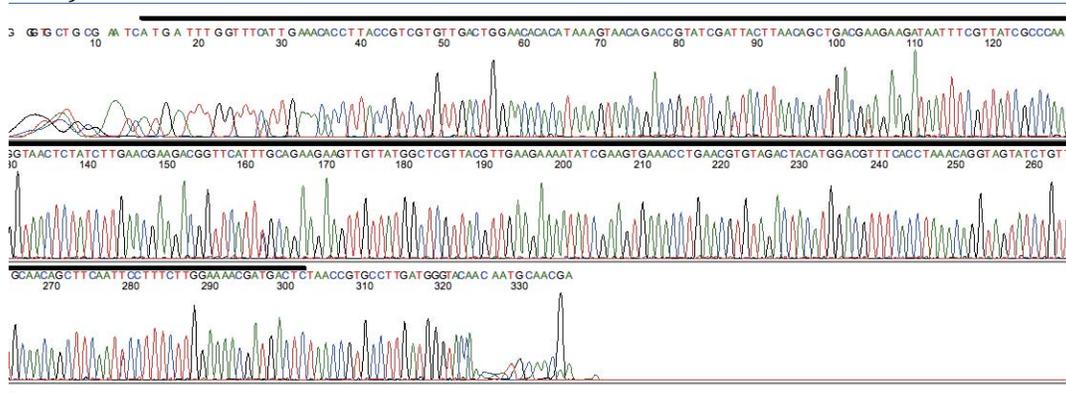
File: V14\_PVr.ab1 Run Ended: 2012/5/30 16:56:21 Signal G:219 A:187 C:274 T:226  
Sample: V14\_PVr Lane: 42 Base spacing: 15.303972 356 bases in 16303 scans Page 1 of 2



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

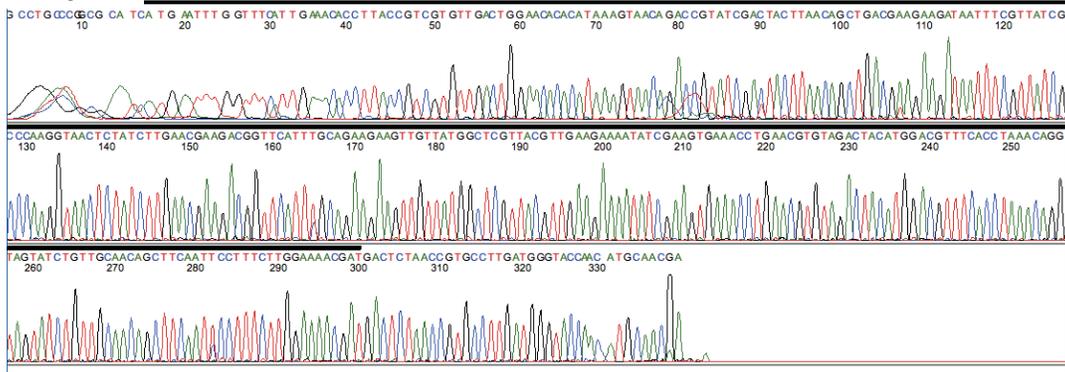
**Secuencias del gen *rpoB***

a) Banda 1



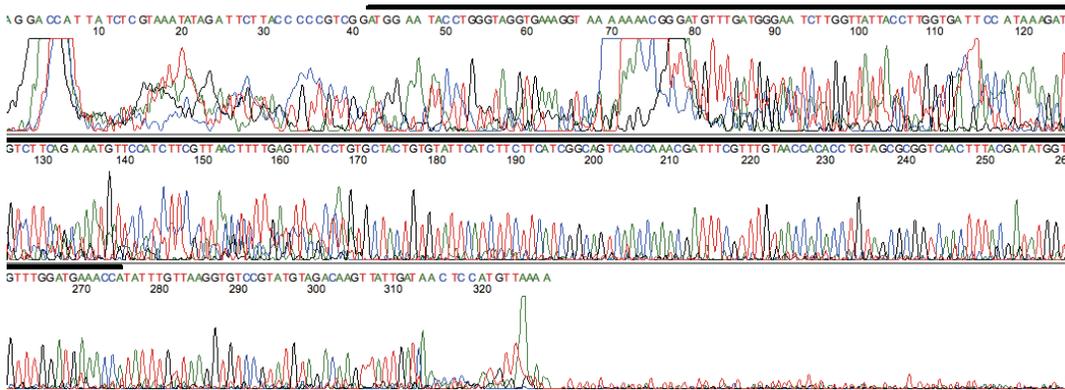
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra

b) Banda 2



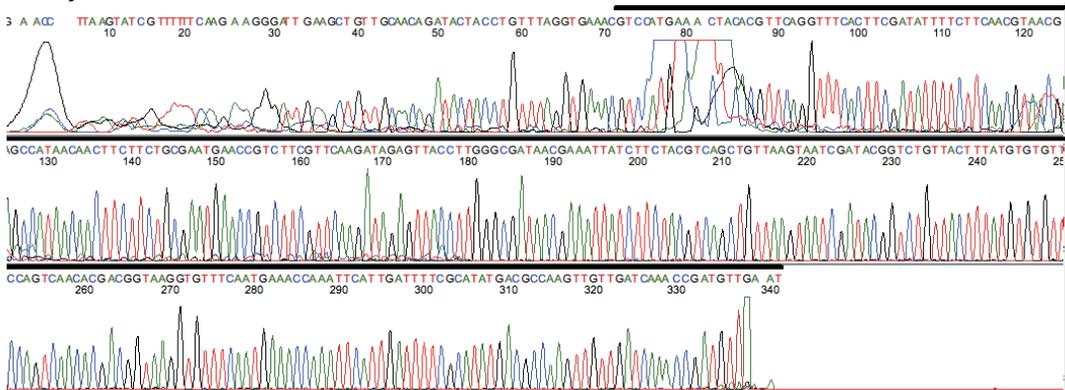
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra

c) Banda 3



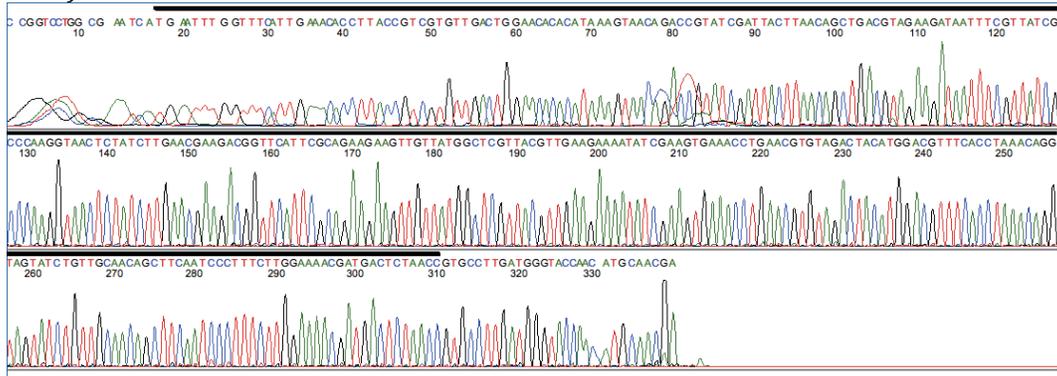
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra

d) Banda 4



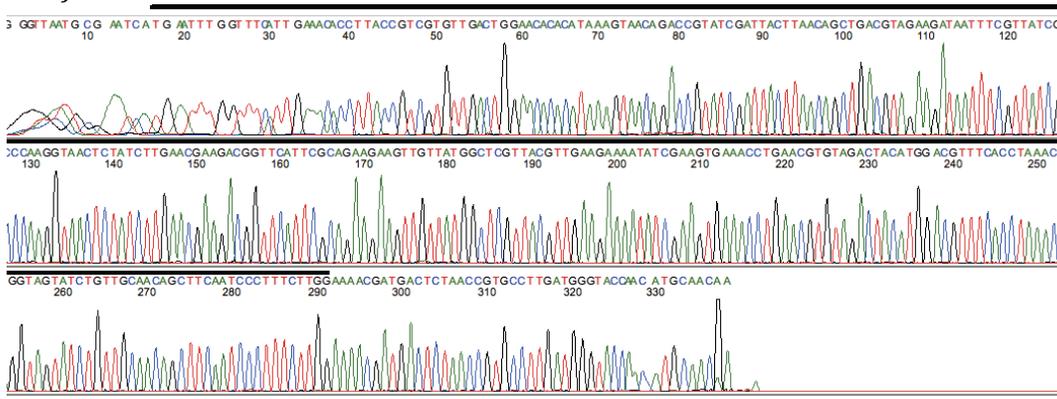
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra

e) Banda 5



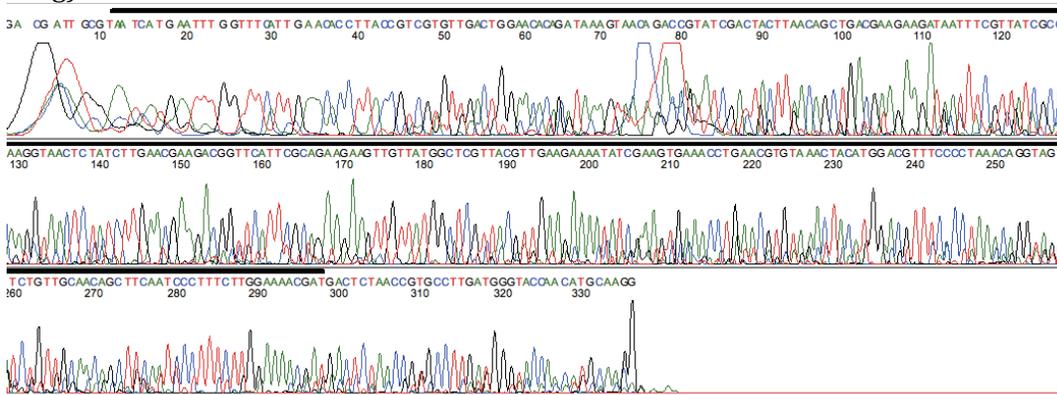
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra

f) Banda 6



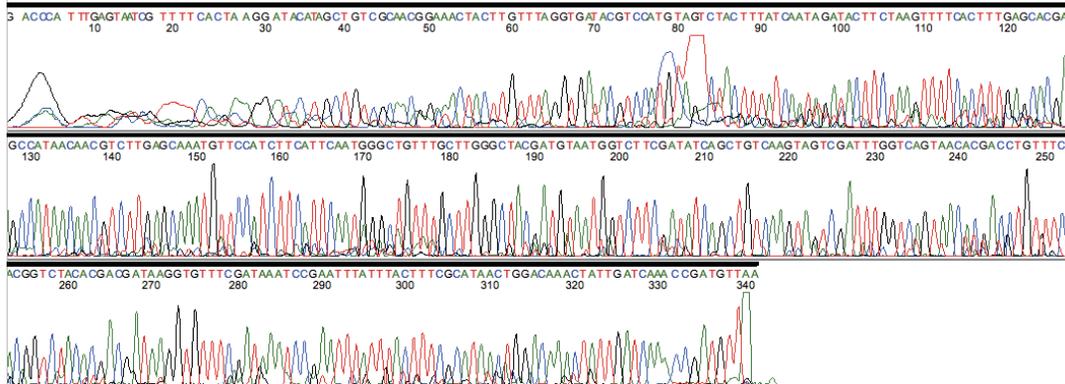
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra

g) Banda 7



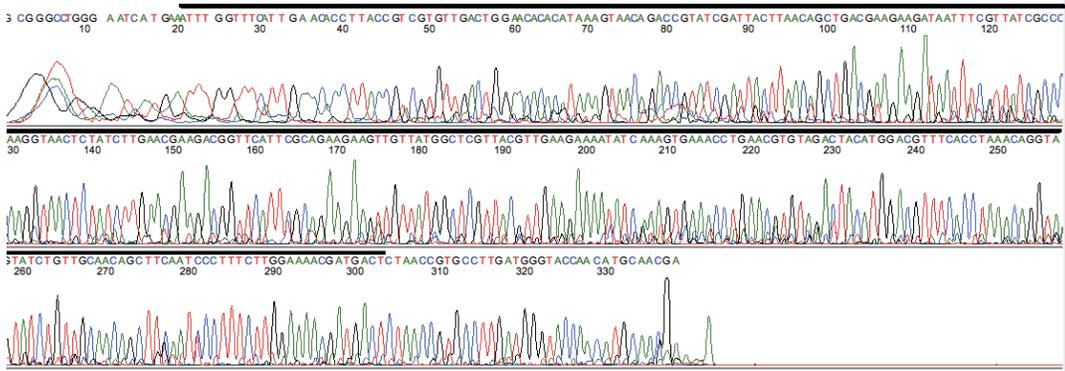
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra

### h) Banda 8



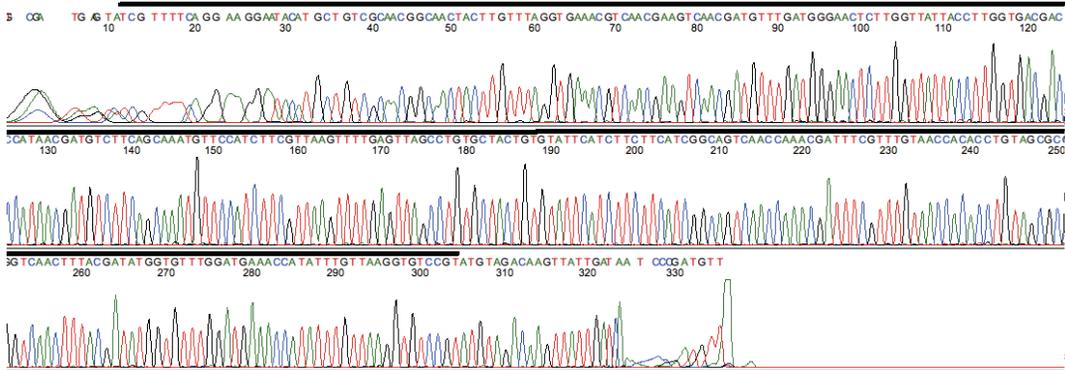
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

### i) Banda 9



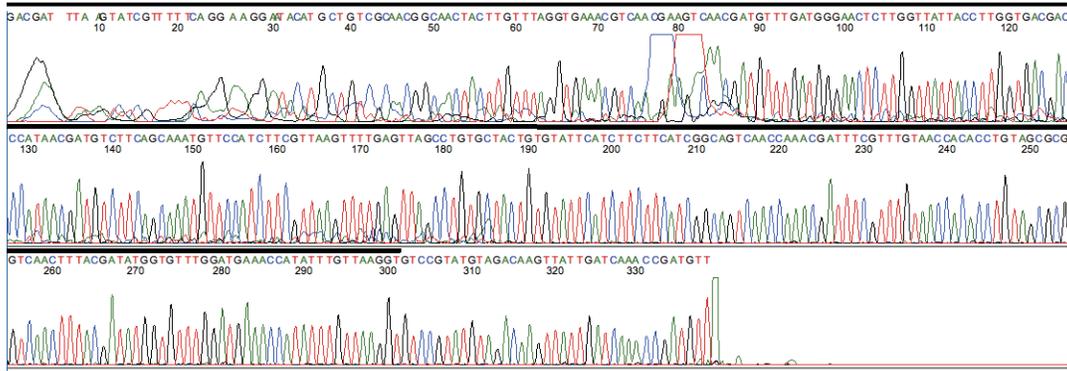
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra

### j) Banda 10



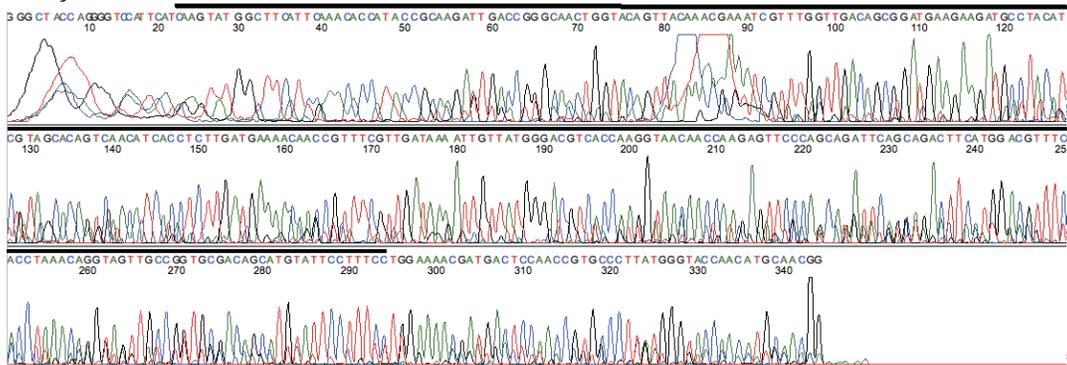
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra

### k) Banda 11



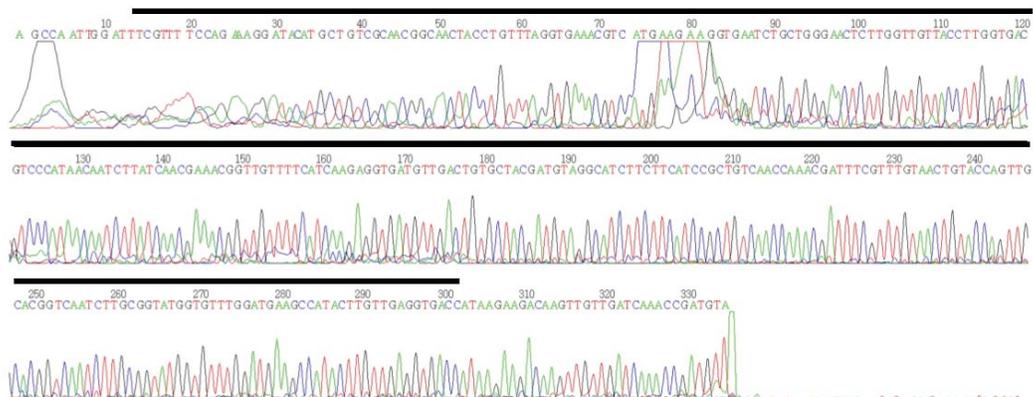
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

### l) Banda 12



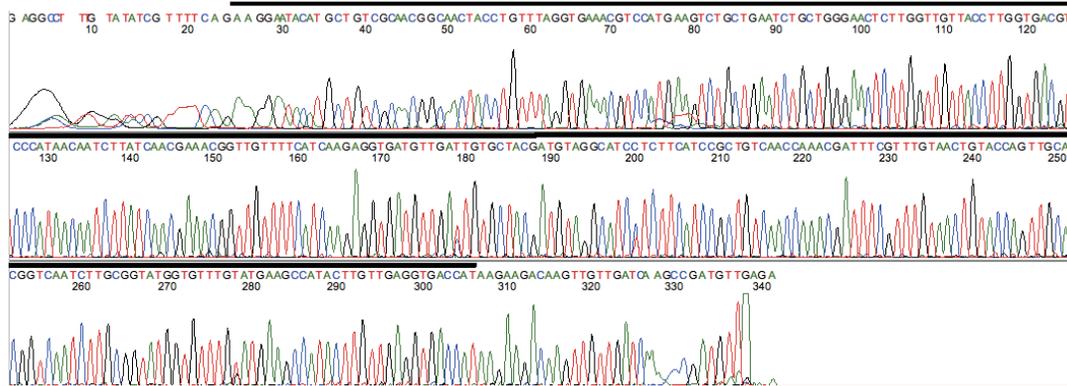
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra

### m) Banda 13



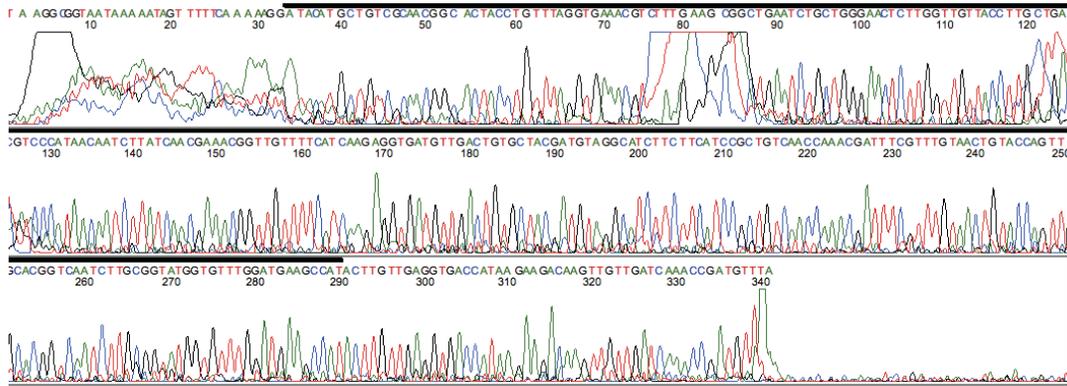
La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra

n) Banda 15



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

o) Banda 16



La secuencia empleada en la clasificación es la señalada con una línea negra  
Secuencia complementaria

**ANEXO II. Tabla con la  
intensidad relativa  
promedio (IRp) de las  
bandas**

<b>Carril Banda</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>IRp por banda</b>
<b>1</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	99211
<b>2</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	54970
<b>3</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	53026.4
<b>4</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	49547.5
<b>5</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	44727	-----	66874	55800.5
<b>6</b>	-----	39648	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	190936	59162.57143
<b>7</b>	238323	61632	5428	-----	-----	247312	-----	-----	12644	-----	38493	161994	82316.54545
<b>8</b>	326349	138144	23322	225072	179492	226722	22098	184382	108460	118371	69842	157876	148344.1667
<b>9</b>	35751	25248	-----	-----	-----	68150	31668	48256	-----	134691	-----	-----	57294
<b>10</b>	-----	22608	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	22608
<b>11</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	86600
<b>12</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	23582
<b>13</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	21420
<b>14</b>	61557	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	168759	31913	-----	87409.66667
<b>15</b>	-----	81888	65136	18240	56902	61364	56376	32132	166982	58701	156886	115072	104867
<b>16</b>	201858	38064	-----	-----	-----	18386	-----	-----	144246	18156	25380	69078	73595.42857
<b>17</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	46823
<b>18</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	13365
<b>19</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	8826.75
<b>20</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	7213
<b>21</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	11286
<b>22</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	14684.66667
<b>23</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	32987.25
<b>24</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	19309
<b>25</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	169366.4

<b>Carril Banda</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>IRp por banda</b>
<b>26</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	202434.75
<b>27</b>	14382	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	16544	36772	22566
<b>28</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	8100
<b>29</b>	12699	13056	-----	-----	-----	-----	-----	-----	15254	23460	24299	9396	16720
<b>30</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	27260	7497	4512	5974	32505.22222
<b>31</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	28101
<b>32</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	29172
<b>33</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	12369
<b>34</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	27303
<b>35</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	25143
<b>36</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	38368
<b>37</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	8764
<b>38</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	53464.66667
<b>39</b>	1326	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	29570.33333
<b>40</b>	39627	-----	-----	-----	-----	10382	-----	-----	-----	-----	-----	10846	20285
<b>42</b>	11373	24048	-----	-----	-----	15718	-----	-----	45066	-----	10387	34684	20086.66667
<b>43</b>	17850	40320	-----	-----	-----	25462	-----	-----	33292	18615	24628	986	26581.625
<b>44</b>	29835	6288	-----	-----	-----	47386	-----	-----	-----	-----	21526	24998	87040
<b>45</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	19894	158554.8
<b>46</b>	52326	27504	13478	-----	-----	38744	-----	-----	25694	13464	18659	45530	57536.72727
<b>47</b>	283713	249456	-----	-----	-----	230028	-----	-----	37816	84558	148755	241744	182295.7143
<b>IRp por carril</b>	88465	54850	21473	81105	78800	82472	27537	66195	56066	57584	42274	70157	

<b>Carril Banda</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>IRp por banda</b>
<b>1</b>	140650	57772	-----	-----	-----	-----	99211
<b>2</b>	-----	29640	-----	77220	58050	54207	54970
<b>3</b>	89800	23660	51480	52780	47412	23883	53026.4
<b>4</b>	63250	29848	-----	44720	60372	27702	49547.5
<b>5</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	55800.5
<b>6</b>	73900	19552	24970	29276	35856	8208	59162.57143
<b>7</b>	51350	16380	-----	25324	46602	7581	82316.54545
<b>8</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	148344.1667
<b>9</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	57294
<b>10</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	22608
<b>11</b>	86600	-----	-----	-----	-----	-----	86600
<b>12</b>	-----	19136	-----	28028	-----	-----	23582
<b>13</b>	-----	-----	13200	29640	-----	19494	21420
<b>14</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	87409.66667
<b>15</b>	110200	103584	200475	175396	218538	21432	104867
<b>16</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	73595.42857
<b>17</b>	16400	57512	29095	52052	79056	-----	46823
<b>18</b>	-----	-----	13365	-----	-----	-----	13365
<b>19</b>	13900	5564	4455	11388	-----	-----	8826.75
<b>20</b>	-----	6396	8030	-----	-----	4788	7213
<b>21</b>	-----	-----	-----	-----	-----	11286	11286
<b>22</b>	16650	10244	17160	-----	-----	-----	14684.66667
<b>23</b>	24800	7384	81565	18200	-----	10773	32987.25
<b>24</b>	18650	19968	-----	-----	-----	-----	19309
<b>25</b>	175600	90844	292820	118872	168696	39387	169366.4

<b>Carril Banda</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>IRp por banda</b>
<b>26</b>		142844	190905	201292	274698	59280	202434.75
<b>27</b>	-----	-----	-----	-----	-----	23712	22566
<b>28</b>	-----	-----	-----	-----	8100	66975	8100
<b>29</b>	-----	18876	-----	-----	-----	51528	16720
<b>30</b>	187900	16744	16280	10504	15876	-----	32505.22222
<b>31</b>	-----	-----	-----	-----	-----	28101	28101
<b>32</b>	-----	-----	-----	29172	-----	-----	29172
<b>33</b>	-----	-----	-----	-----	-----	12369	12369
<b>34</b>	-----	-----	-----	-----	-----	27303	27303
<b>35</b>	-----	-----	-----	29172	21114	30324	25143
<b>36</b>	18300	17004	-----	52936	65232	76152	38368
<b>37</b>	-----	-----	-----	10400	7128	50103	8764
<b>38</b>	-----	87256	-----	56992	16146	147687	53464.66667
<b>39</b>	16800	25688	17710	8060	107838	10659	29570.33333
<b>40</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20285
<b>42</b>	6450	-----	5390	27664	-----	27075	20086.66667
<b>43</b>	51500	-----	-----	-----	-----	-----	26581.625
<b>44</b>	32050	196040	15565	280280	216432	257925	87040
<b>45</b>		312728	24640	148772	286740	222642	158554.8
<b>46</b>	83150	265460	48895	-----	-----	-----	57536.72727
<b>47</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	182295.7143
<b>IRp por carril</b>	63895	65839	58667	66006	96327	50791	

## Bibliografía

- 1- 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*" International Journal of Food Microbiology 12, 215-219.
- 2- Adekambi T., Drancourt M., Raoult D. 2009. "The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists" 2009. Trends in Microbiology 17, 37-45
- 3- Ajith Abraham, Aboul Ella. Foundations of computational intelligence: Data mining, Volumen 6. Springer. USA
- 4- Álvarez, B.R., Barragán, E. y Chombo, P. 2005. Reglas de uso. Marca Colectiva "Queso Cotija Región de Origen", México. pp.1, 10, 12, 14, 15.
- 5- Ash, C., Farrow, J.A., Dorsch, M., Stackebrandt, E. Collins, M.D. 1991 "Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA" International Journal Systematic Bacteriology 41, 343 - 346.
- 6- Ashis Sengupta. 2009. Advances in multivariate statistical methods. World Scientific. Singapur
- 7- Bravo Mendoza, A. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas de queso Cotija. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- 8- Campbell, I. & Priest, F.G. 1996. Brewing Microbiology. Second edition, International center for brewing and distilling, Chapman & Hall, U.K, pp. 134-156.
- 9- Cerritos R., Vinuesa P., Eguiarte L.E., Herrera-Estrella L., Alcaraz- Peraza L.D., Arvizu- Gomez J.L., Olmedo G., Ramirez E., Siefert J.L., Souza V. 2008. "*Bacillus coahuilensis* sp. Nov., a moderately halophilic species from a dessication lagoon in the Cuatro Cienegas Valley in Coahuila, Mexico". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58, 919-923.
- 10- Cheung P., Lo K., Cheung T., Yeung W., Leung P. Man Kam K. 2008. "*Streptococcus suis* in retail markets: How prevalent is it in raw pork?" International Journal of Food Microbiology 127, 316-320
- 11-Corredoira J., Alonso M., Coira A., Varela J. 2008. "Association between *Streptococcus infantarius* (Formerly *S. Bovis* II/1) bacteremia and noncolonic cancer" Journal of Clinical Microbiology 46, 1570.
- 12-Cortés Díaz, L.A. 2009. Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa en la búsqueda de bacterias ácido lácticas en un queso artesanal mexicano. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. pp. 14-17.
- 13-Dahllof, I., Baillie, H., Kjelleberg, S. 2000. "RpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in the 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity". Applied Environmental Microbiology 40, 1333-1338
- 14-Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. "Colorimetric method for determination of dugars and related substances". Analytical Chemistry 28, 350-256
- 15-Eck, A. 1990. El queso, Ediciones >Omega, Barcelona, España
- 16-Ercolini Danilo. 2004. "PCR- DGGE fingerprinting novel strategies for detection of microbes in food" Journal of Microbiological Methods la 56, 297-314

- 17- Escalante A., Wachter, C., Farres A. 2001. "Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis". *International Journal of Food Microbiology*.64, 21-31
- 18- Fernández- Garayzábal J., Fernández E., Las Heras A., Pascual C., Collins M., Domínguez L. 1998. "Streptococcus parasanguinis: New pathogen Associated with Asymptomatic Mastitis in Sheep" *Emerging Infectious Diseases* 4, 645- 647.
- 19-Fox, P., Guinee, T.P., Cogan, T.M. McSweeney, P.L.H.. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland.
- 20-Freitas A., Pintado A., Pintado M., Malcata F. 1999. "Organic acids produced by lactobacilli, enterococci an yeasts isolated from Picante cheese". *European Food Research and Technology* 6, 434- 438
- 21-Fox G.E., Pechman K.R., Woese C.R. 1977. "Comparative Cataloging of 16S ribosomal ribonucleotic acid: molecular approach to prokaryotic systematics". *International Journal of Systematic Bacteriology*.27, 44- 57.
- 22-Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T. M., McSweeney P. L. H., 2000. *Fundamentals of cheese science*. Aspen Publishers. Maryland
- 23- Franz C., Holzapfel W., Stiles M. 1999. "Enterococci at the crossroads of food safety" *International Journal of Food Microbiology* 47,1-24
- 24-García- Saturnino V., Quirasco Baruch M. 2010 "Innovation in Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries". *Asociación Mexicana de la Ciencia de los Alimentos*. Queretaro, México.
- 25-García- Saturnino V. 2006. Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolitica del queso Cotija. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- 26-Ghebremedhin B., Layer F., Konig W., Kong B. 2008. "Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences" *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1019-1025.
- 27-Gómez Castelo B. 2010. Identificación de bacterias halófilas presentes en queso Cotija por métodos independientes de cultivo. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, pp 43-46.
- 28-Hernández-Briones, V. 2007. Queso Cotija: Estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. UNAM
- 29-Hernández Mejía N. 2007. Identificación de bacterias proteolíticas aisladas de queso Cotija, un estudio microbiológico y fisicoquímico. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- 30- Hoppe- Seyler T., Jaeger B., Bockelmann W., Hoordman W., Geis A., Heller K. 2004. "Molecular identification and differentiation of *Staphylococcus* species and strains of cheese origin" *Systematic Applied Microbiology*, 27, 211-218
- 31-Horwitz W. 1975 AOAC. *Officials Methods of Analysis of the Association of oficial analytic chemists*. Chapter 3.
- 32- Hwang H., Chang C., Chang L., Chang S., Chang Y., Chen Y. 2003, "Characetrization of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan" *Journal of Medical Microbiology* 52, 239- 245
- 33- Jans C., Bugnard J., Njage P., Lacroix C., Meile L. 2012 ."Lactic acid bacteria diversity of African raw and fermented camel milk products reveals a highly

- competetitive, potentially health- threatening predominant microflora”  
Food Science and Technology. 47, 371-379
- 34-Jans C., Follador R., Lacroix C., Meile L., Stevens M. 2012. “Complete genome sequence of the african dairy isolate Streptococcus *infantarius* subsp. *infanatarius* strain CJ18” Journal of Bacteriology 194, 2105- 2106
  - 35-Jany, J.L. and Barbier, G. 2008 “Culture independent methods for identifying microbial communities in cheese. Food Microbiology”, 25. 839-848.
  - 36-Kirk R.S., Sawyer R., Egan H. 1996. Composición y análisis de alimentos de Pearson, segunda edición; Compañía editorial continental SA de CV, México,
  - 37-Klenk H., Zillig W. 1994. “DNA-Dependent RNA Polymerase Subunit B as a Tool for Phylogenetic Reconstructions: Branching Topology of the Archaeal Domain”. Journal of Molecular evolution 38, 420-432
  - 38-Macé S., Cornet J., Chevalier F., Cardinal M., Pilet M., Dousset X., Joffraud J. 2012. “Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo solar*) steaks stored under vaccum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR- TGGE”. Food Microbiology 30, 164-172.
  - 39- Martin- Platero A., Maqueda M., Valdivia E., Purswani J., Martinez- Bueno M. 2009. “Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats’ milk cheeses from Sierra de Aracena”. Food Microbiology,26, 294- 304.
  - 40-Morse R. O’Hanlon K, Collins M.D. 2002. “Phylogenetic, amino acid content and indel analyses of the  $\beta$  subunit of DNA- dependent RNA polymerase of Gram- positive and Gram- negative bacteria”. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 1477- 1484
  - 41-Muyzer G., Smalla K. 1998. “Application of denaturing gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology” Antonie van Leeuwenhoek 73, 127-141
  - 42-Narag Anurag. 2008. Functional analysis of genes using the gene ontology: Gene similarity, clustering, and classification. Thesis. The University of Houston- Clear Lake.
  - 43-Nielsen S. 1998. Food Analysis Second Edition; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland.
  - 44-Noguchi H., Uchino M., Shida O., Takano K., Nakamura L. K., Konagata K. 2004. “Bacillus vietnamensis sp. Nov., a moderately halotolerant, aerobic, endospore- forming bacterium isolated from Vietnamese fish sauce” International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 2117-2120.
  - 45-Norma Mexicana. Norma NMX-F-098-1976. Determinación en proteínas en queso. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.
  - 46-Norma Oficial Mexicana. Norma NOM-F-100-1984. Alimentos- Lácteos- Determinación de grasa butírica en quesos. Secretaría de comercio y Fomento Industrial.
  - 47- Norma Mexicana. NMX-F-099-1970. Método de prueba para la determinación de pH en quesos procesados. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.
  - 48-Norma Mexicana. NMX-F-206-1986. Determinación de acidez expresada como ácido láctico en leche en polvo. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.

- 49- Nováková D., Sedlacek I., Pantucek R., Stetina V., Svec P., Petras P. 2006. "Staphylococcus equorum and Staphylococcus succinus isolated from human clinical specimens". Journal of Medical Microbiology. 55, 523-526.
- 50- Rantsiou, K., G. Comi, and L. Cocolin. 2004. "The *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics during food fermentations". Food Microbiology 21, 481-487.
- 51- Place R., Hiestand D., Gallmann H., Teuber M. 2003. "Staphylococcus equorum subs. Linens, subs. Nov., A starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses" Systematic Applied Microbiology 26, 30-37
- 52-Renouf V., Claisse O., Sertier S., Lonvaud-Funel A. 2006. "rpoB gene: A target for identification of LAB cocci by PCR-DGGE and melting curves analyses in real time PCR" Food Microbiology. 23, 136-145
- 53-Renouf V., Claisse O., Lonvaud-Funel A. 2006. "Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis" Journal of Microbiological Methods 67, 162-170
- 54-Rodicio M., y Mendoza M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Métodos Microbiológicos para el Diagnóstico Clínico. 22, pp 238-245.
- 55-Scott Maxwell, Delaney Harold. 2004. Designing experiments and analyzing data: a model comparison perspective, Volumen 1. Lawrence Erlbaum Associates. USA
- 56-Self R. 2005. Extraction of Organic Analytes from foods. Royal Society of Chemistry. Cambridge UK.
- 57-Villegas, A. 2004. Tecnología quesera. Editorial Trillas México D.F. pp. 316-321.
- 58- Vos M., Quince C., Pijl A., Hollander M., Kowalchuk G. 2012. "A Comparison of *rpoB* and 16 rRNA as Markers in Pyrosequencing Studies of Bacterial Diversity". Plos ONE. 7, 1-8
- 59-Wacher Rodarte C., Díaz Ruiz G. 2003. "Métodos para el estudio de comunidades microbianas e alimentos fermentados" Revista latinoamericana de Microbiología 45, 30-40
- 60-Watson J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R. 2008. Molecular Biology of the Gene. Pearson, Sixth Edition, pp 750- 752
- 61-Wintzingerode F., Gobel U., Stackebrandt E. 1997. "Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR- based rRNA analysis" FEMS Microbiology Reviews 21, 213-229
- 62- Wu T., Zhao Z., Zhang L., Ma H., Lu K., Ren W., Liu Z., Chang H., Bei W., Qiu Y., Chen H. 2011. "Trigger factor of Streptococcus suis is involved in stress tolerance and virulence". Microbial Pathogenesis 51, 69-76
- 63-Yoon JH., Oh TK., Park YH. 2004. "Transfer of Bacillus halodenitrificans Denariáz *et al.* 1989 to the genus Virgibacillus as Virgibacillus halodenitrificans comb. nov." . International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 2163- 2167.
- 64-Zúñiga-Bustos, A. 2009. Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por métodos moleculares. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.