



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
DOMINANTES EN QUESO COTIJA ARTESANAL
MADURADO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

MARICARMEN CASTAÑEDA REYES

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: FRANCISCO RUÍZ TERÁN

VOCAL: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

SECRETARIO: ALEIDA MINA CETINA

1er. SUPLENTE: HUGO ANTONIO HERNÁNDEZ PÉREZ

2° SUPLENTE: NAYELI HERNÁNDEZ MEJÍA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

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 IN222115: “Análisis funcional del metagenoma bacteriano, inocuidad y potencial biotecnológico del género *Enterococcus* del queso Cotija”, el cual también apoyo con recursos para becar al estudiante. Así mismo, se recibió apoyo económico del Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP-FQ) con clave 5000-9102.

Se agradece la donación de cepas a la Dra. Carmen Wachter y al cepario de la Facultad de Química, para la realización de este trabajo.

ASESOR DEL TEMA

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Supervisor Técnico

Dra. Grisel Alejandra Escobar Zepeda

Sustentante

Maricarmen Castañeda Reyes

Agradecimientos

A Dios por darme la fuerza, y la inteligencia para elegir esta carrera y permitirme concluirla.

A mí querida Universidad y Facultad de Química por permitirme ser parte de su comunidad, por formarme como Químico de alimentos y por brindarme una de las experiencias más enriquecedoras de toda mi vida.

A la Dra. Maricarmen Quirasco, por invitarme a formar parte de este gran proyecto, por su paciencia, compromiso, apoyo, y orientación durante el desarrollo del mismo.

A los miembros del jurado: Aleida Mina y Francisco Ruíz, por su tiempo y disposición en la revisión de éste trabajo.

A mis padres, por su amor, apoyo incondicional, y paciencia. Para ustedes mi mayor reconocimiento. Éste logro también es de ustedes, con todo mi amor y cariño. Los amo.

A mi mamá Luz del Carmen, por ser mi mayor ejemplo a seguir, por tu amor incondicional, y apoyo infinito. Tú eres uno de los motores que me impulsa a ser mejor persona. Agradezco todo tu esfuerzo y dedicación ya que sin ellos no sería la persona que soy ahora. Gracias por tanto mami, espero que toda la vida te sientas orgullosa de mí. Te amo.

A mi papá Moisés Castañeda, por ser ese ángel que me cuida y me acompaña siempre. Por tener tiempo de sobra para mí y mis hermanos. Gracias por darme la vida y ser mi héroe incondicional. Te amo.

A mis hermanos Dulce y Erick, que con su amor me han enseñado a salir adelante. Gracias por su paciencia y confianza; por preocuparse siempre por su hermana mayor. Pero sobre todo por compartir su vida conmigo y festejar cada logro juntos. Mi existencia no sería la misma sin ustedes. Los adoro.

A mis abuelitos Alberto y Lorenza, gracias por consentirme tanto, por darme su amor y estar siempre ahí para mí. Beto, sé que Dios ya no te permitió verme concluir esta etapa, pero desde donde estés espero que te sientas orgulloso de mí.

A mis amigos del Laboratorio 312, Claudia Alberto, Augusto Castro, Sara Morales, Carlos Vega, Alberto Mora, Mich Bellmunt, Rafael Hernández, Andrés Guzmán, Magdalena

Sánchez, Karina Rosete, gracias por su amistad y por cada momento único, sin ustedes mi estancia no hubiera sido igual. Los llevo en mi corazón siempre.

A Alejandra Escobar, Myrna Olvera, Manuel Campos, Lalo Serrano, integrantes del L-312 por su apoyo y orientación durante aquellos momentos de duda.

A mis amigos de la H. Facultad de Química: Zaira Aviña, Jorge Valdés, Alejandro Otero, Arturo Verduzco, Lorena Zulueta, Karen Abrego, Magali Silvar, Lupita Manzano, Alessandra Quiroz, Pitt Ramírez, Pablo Raña, Juan Gutiérrez, José Becerril, Yeyo Ampudia y Marco Ibarra, por formar parte de una de las etapas más memorables de mi vida. Por siempre mi cariño y afecto.

A mis queridos amigos de prepa 8: Brenda Trejo, Carlos Ramírez, Ruth Trujano, Majo Noval y Brenda Dzul, por compartir conmigo una de las etapas más bonitas. Sigamos cultivando éxitos juntos.

A Laura Cid, Ulises Jiménez y Erick Velázquez, por su amistad, y por hacer tan agradable mi estadía. Les recordaré toda la vida.

A mis amigos de Saarka Nutrición y Tecnología: Frida Carpinteyro (my other half), Yuri Mejía, Doña Cele, David Nava, y Susana Tiburcio por su apoyo y amistad durante todo este tiempo. Un pedacito de mi corazón se queda con ustedes eternamente.

Índice

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	3
I. INTRODUCCIÓN	5
II. MARCO TEÓRICO	7
2.1 QUESO COTIJA	7
<i>Proceso de elaboración del queso Cotija</i>	8
2.2 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)	10
<i>Generalidades</i>	10
<i>Metabolismo</i>	11
<i>Funciones</i>	12
IMPORTANCIA DE LAS BAL EN ALIMENTOS.....	14
COMPUESTOS DE INTERÉS PRODUCIDAS POR BAL	14
<i>Bacteriocinas</i>	14
<i>Ácido láctico</i>	15
<i>Peróxido de hidrógeno</i>	16
2.3 ANTECEDENTES EN EL GRUPO DE TRABAJO.....	16
2.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS GÉNEROS DOMINANTES EN QUESO COTIJA.....	19
<i>Lactobacillus</i>	19
<i>Weissella</i>	20
<i>Leuconostoc</i>	22
2.5 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS POR SECUENCIACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S.....	23
<i>El gen ribosomal 16S como marcador filogenético</i>	23
<i>Reacción de PCR</i>	25
<i>Secuenciación</i>	28
<i>Análisis filogenético</i>	30
III. JUSTIFICACIÓN	32
IV. HIPÓTESIS	32
V. OBJETIVOS	33
VI. METODOLOGÍA	34
6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
6.2 DESCRIPCIÓN DE CEPAS CONTROL	35
6.3 CULTIVO DE BACTERIAS	35
6.4 PROCEDENCIA DE LOS QUESOS UTILIZADOS EN EL POOL	36
6.5 AISLAMIENTO DE COLONIAS A PARTIR DE UNA MEZCLA DE QUESOS COTIJA	37
6.6 ANÁLISIS CON MÉTODOS MOLECULARES	39
<i>Extracción de ADN</i>	39
<i>Reacciones de PCR</i>	40
<i>Análisis de amplicones</i>	41
<i>Identificación</i>	41
6.7 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	41

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
7.1 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CEPAS CONTROL	42
7.2 CULTIVO DE CEPAS CONTROL EN MEDIOS COMERCIALES.	44
7.3 CULTIVO DE CEPAS CONTROL EN MEDIO DE QUESO COTIJA.....	49
7.4 AISLAMIENTO DE COLONIAS A PARTIR DE UN “POOL” DE QUESOS COTIJA.....	49
7.5 ANÁLISIS DE ADN EXTRAÍDO.....	61
7.6 ANÁLISIS DE AMPLICONES.....	61
7.7 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.....	63
7.8 CARACTERÍSTICAS Y FILOGENIA DE LOS MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS	67
VIII. CONCLUSIONES	75
IX. PERSPECTIVAS	76
X. ANEXOS	77
1. TINCIÓN DE GRAM (MANUAL DE TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS. 2 ^A ED. FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM)	77
2. CONSERVACIÓN DE CEPAS.....	77
3. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN KIT FAST ID.	77
4. CONCENTRACIÓN DE ADN.....	78
5. PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE PCR (DNA CLEAN & CONCENTRATOR™ -5. (DE ZYMO RESEARCH)	79
6. SECUENCIAS DEL GEN RIBOSOMAL 16S	80
7. ALINEAMIENTOS DE LAS SECUENCIAS CONSENSO	80
XI. BIBLIOGRAFÍA	83

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Condiciones de cultivo a evaluar para el aislamiento de los géneros de interés 38

Tabla 2. Características macroscópicas para cada género de BAL. 38-39

Tabla 3. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación del gen ribosomal 16S en eubacterias. 40

Tabla 4. Concentración de reactivos para la PCR 40

Tabla 5. Morfología microscópica característica de las cepas usadas como control. 43

Tabla 6. Relación de colonias aisladas del pool de queso Cotija 50-52

Tabla 7. Relación de colonias seleccionadas para su identificación mediante la amplificación del gen ribosomal 16 S. 56-60

Tabla 8. Tabla de identidad de las cepas muestra comparadas con la base de datos del NCBI (16S ribosomal RNA Sequences (Bacteria and Archaea). 63-65

Figura 1. Zona productora de queso Cotija Región de Origen en la Sierra de JalMich 7

Figura 2. Proceso de elaboración de queso Cotija 8

Figura 3. Productos de la vía fermentativa de la glucosa por diferentes microorganismos (A) BAL homofermentativas; (B) BAL heterofermentativas, (C) y (D) *Propionibacterium*; (F) *Saccharomyces spp.*; (G) *Acetobacter spp.* 13

Figura 4. Proporción de las poblaciones dominante y subdominante identificadas en el metagenoma de queso Cotija por dos metodologías distintas. 17

Figura 5. Géneros dominantes y subdominantes encontrados por análisis metagenómico en queso Cotija con tres meses de maduración. 18

Figura 6. Imagen de microscopía electrónica de *Lactobacillus plantarum*. 20

Figura 7. Imagen de microscopía electrónica de *Weissella koreensis*. 21

Figura 8. Imagen de microscopía electrónica de *Leuconostoc mesenteroides*. 23

Figura 9. Estructura secundaria del ARN 16S. 24

Figura 10. Proceso de replicación del ADN a nivel celular. 25

Figura 11. Amplificación de ADN mediante PCR. 27

Figura 12. Método de secuenciación enzimática de ADN. 29

Figura 13. Ejemplo de patrones de secuenciación automática. 30

Figura 14. Tinción de Gram para *L. mesenteroides*. 43

Figura 15. Tinción de Gram para *W. paramesenteroides*. 43

Figura 16. Tinción de Gram para *Lb. plantarum* 43

Figura 17. Crecimiento de las 4 cepas control en medio líquido APT, condiciones de aerobiosis, anaerobiosis y microaerofilia. Producción de gas (símbolo amarillo) 45

Figura 18. Crecimiento de las 4 cepas control en medio líquido MRS con vancomicina (0.5 mg/mL), condiciones de aerobiosis, anaerobiosis y microaerofilia. Producción de gas (símbolo amarillo) 46

Figura 19. Crecimiento de las 4 cepas control en medio líquido MRS pH=4, condiciones de aerobiosis, anaerobiosis y microaerofilia. Producción de gas (símbolo amarillo) 47

Figura 20. Cinética de crecimiento para las cepas control en medio líquido MRS pH=4 a 29°C, condiciones de aerobiosis durante 24 h. 48

Figura 21. Cocos Gram (+) agrupados en pares y racimos aislados de la condición 1. 54

Figura 22. Bacilos Gram (+) agrupados en cadenas aislados de la condición 1. 54

Figura 23. Levaduras teñidas con cristal violeta aislados de la condición 5. 54

Figura 24. Cocos Gram (+), agrupados en racimos y cadenas aislados de la condición 1. 54

Figura 25. Bacilos Gram (+) aislados de la condición 5. 54

Figura 26. Cocos Gram (+), agrupados en parejas y cadenas aislados de la condición 1. 55

Figura 27. Bacilos Gram (+) aislados de la condición 2. 55

Figura 28. Cocos Gram (+), agrupados en racimos, condición 1. 55

Figura 29. Bacilos Gram (+), esporulados agrupados en cadenas, condición 8. 50

Figura 30. Gel de agarosa al 1%, productos de la reacción de amplificación. Carril 1 (T1), Carril 2 (T2), Carril 3 (T3), Carril 4 (T4), Carril 5 (T5), Carril 6 (T6), Carril 7 (marcador GeneRuler1Kb DNA Ladder), Carril 8 (M). 62

Figura 31. Gel de agarosa al 1%, productos de la reacción de amplificación, Carril 1 (A), carril 2 (B). Carril 3 (C), Carril 4 (D), Carril 5 (E), Carril 6 (F), Carril 7 (G), Carril 8 (marcador GeneRuler1Kb DNA Ladder). 62

Figura 32. Relación filogenética de las cepas agrupadas como *Lactobacillales*. Árbol consenso. Se utilizó *E. coli* como referencia externa para representar una secuencia diferente a los géneros *Enterococcus*, *Weissella*, y *Pediococcus*. 67

I. INTRODUCCIÓN

El Queso Cotija Región de Origen es un producto lácteo artesanal, madurado, que se elabora a partir de leche bronca proveniente de ganado cebú o criollo; sin la adición de algún cultivo iniciador. Su fermentación y posterior maduración es llevada a cabo por la interacción de la microbiota proveniente de la sal adicionada, la atmosfera local y la que se inocula debido al contacto con el quesero. En éste alimento fermentado se han identificado diferentes microorganismos provenientes de las materias primas, y en el producto terminado mediante métodos moleculares dependientes de PCR. Cabe resaltar que algunos de estos géneros no se han podido encontrar por métodos dependientes de cultivo, los cuales pueden favorecer la recuperación de determinadas especies que no son necesariamente las más abundantes en una comunidad microbiana (Escobar, 2016). Entre los principales géneros aislados encontramos a *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus*. Sin embargo, en un trabajo reciente, se concluyó que los tres géneros identificados con mayor frecuencia por la técnica de DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante), *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Enterococcus spp.*, representan únicamente el 11% del total de la microbiota bacteriana en una pieza de queso Cotija, sin dominancia de alguno de ellos (Escobar, 2016). El 89% restante podría estar conformado por bacterias de otros géneros (*Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Virgibacillus*, *Marinilactibacillus*) o de microorganismos que no se han podido identificar con anterioridad (Escobar, 2012). Debido a ello se realizó el análisis del metagenoma de la comunidad bacteriana del queso Cotija, a través de secuenciación masiva (Escobar, 2016). En dicho análisis, se encontraron mediante la anotación taxonómica con genes marcadores ribosomales y de copia única un número muy alto de taxa, referidos en su mayoría a Firmicutes y algunas de los fila Actinobacterias y Proteobacterias de todas las clases. Resultó interesante que los géneros dominantes: *Weissella*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, poco comunes en quesos, no se habían recuperado por aislamiento con los medios de cultivo. El hecho de no haber identificado por métodos tradicionales, ni dependientes de PCR-DGGE a los géneros más importantes en

dominancia puede deberse a la dificultad de cultivar a las bacterias ácido lácticas (BAL) que de por sí se definen como de requerimientos fastidiosos, lo que implica que en el ambiente en el que crecen, se deben encontrar factores de crecimiento tales como aminoácidos y péptidos, carbohidratos fermentables, ácidos grasos libres, ácidos nucleicos y otros compuestos como el ácido nicotínico y vitaminas hidrosolubles como biotina, tiamina y ácido pantoténico o sus derivados (Björkroth et al., 2006). Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente estudio es lograr el aislamiento de cepas de los géneros dominantes identificados como tales por metagenómica, a través de la utilización de medios y condiciones de cultivo que permitan aportar los nutrientes necesarios para su crecimiento, principalmente pH y presencia de oxígeno. La pregunta planteada en éste trabajo deriva de los resultados generados a partir del análisis bioinformático de fragmentos de secuencias de ADN, pero el aislamiento de los géneros dominantes característicos del queso Cotija, da paso a la evaluación experimental de su metabolismo lo que dará luz sobre su rol en la comunidad y, eventualmente la descripción de sus funciones, en especial aquellas que podrían ser interesantes para su aplicación en la elaboración de otros alimentos.

El queso Cotija es considerado único y legítimo, debido a las propiedades organolépticas que posee, debe su nombre a la Ciudad de Cotija de la Paz en el estado de Michoacán donde se comercializa tradicionalmente. Sin embargo, existen otras zonas reconocidas para su producción destacando los municipios de Santa María del Oro, Jilotlán de los Dolores, Tamazula, Valle de Juárez en Jalisco y en el estado de Michoacán, encontramos el sur de Tocuambo, los Reyes, Peribán, Tancítaro, Buena Vista, Tomatlán y Cotija, como se muestra en la [Figura 1](#) (Guzmán, 2015).

Proceso de elaboración del queso Cotija

Los pasos principales en el proceso de elaboración del queso Cotija de acuerdo a la Norma y Reglas de uso para Queso Cotija auténtico (NMX-F-735- COFOCALEC-2011), se ilustran en la [Figura 2](#).

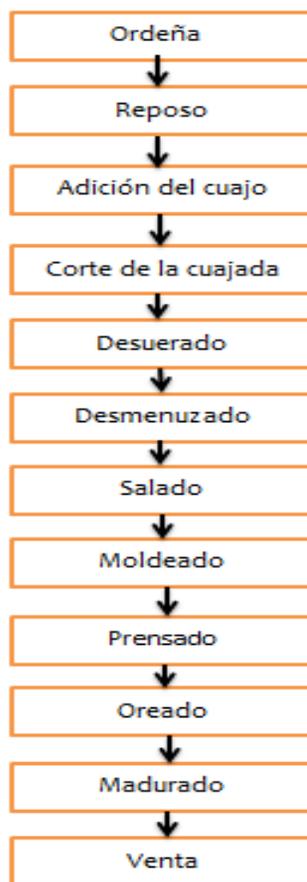


Figura 2. Proceso de elaboración de queso Cotija

Ordeña

La vaca es ordeñada y la leche obtenida se hace pasar por cedazos limpios con el fin de retener cualquier materia extraña.

Reposo

La leche se deja reposar generalmente en un recipiente de acero inoxidable limpio hasta que alcance una temperatura de alrededor de 34°C para ser cuajada.

Adición del cuajo

Una vez que la leche alcanza la temperatura óptima para ser cuajada se adiciona el cuajo (Cuamex, cuajo estandarizado, enzimas coagulantes de leche bovina, CHR Hansen de México) y se mezcla rápidamente. Para esto se utilizan grandes tinas de acero inoxidable o plástico donde se lleva a cabo el cuajado de la leche obtenida de un día (aproximadamente 100 L, dependiendo del tamaño del rancho). El tiempo de coagulación es variable, desde 30 minutos hasta más de una hora. (García, 2011)

Corte de la cuajada

Se corta la cuajada con una cuchara o un cuchillo hasta obtener grumos equivalentes al tamaño de un grano de maíz.

La mezcla se deja reposar hasta que la cuajada cortada se asiente en el fondo del recipiente, es posible asentarla de manera manual ejerciendo presión con una cuchara de acero inoxidable.

Desuerado

Posteriormente el suero se drena o se saca con un recipiente limpio. La cuajada se separa del suero y se deja escurrir en una artesa de madera o acero inoxidable.

Desmenuzado

Cuando se pierde el exceso de suero, la cuajada se desmenuza o desmorona manualmente en su totalidad hasta obtener una masa homogénea.

Adición de sal

La cuajada desmoronada se sala y mezcla manualmente para lograr distribuirla lo mejor posible. La cantidad de sal no está estandarizada, se agregan aproximadamente 140 g de sal por cada 20 litros de leche, lo que equivale en promedio a 0.05 g de sal por cada gramo de cuajada fresca.

Moldeado y prensado

La masa salada se moldea en un aro cubierto en su interior con dos bandas de ixtle (fibra de maguey), se llena el aro y se envuelve la masa.

La pasta fajada se prensa de 18-24 horas, volteándola sobre su propia cara al concluir ese período.

Desfajado, oreado y maduración.

La pasta ya prensada se mantiene fajada para que no pierda el formato cilíndrico tradicional y, se voltea sobre su cara diariamente durante 15 días o hasta que obtenga la firmeza necesaria. El queso se desfaja (se le quita el aro) cuando la consistencia es adecuada y se sigue volteando durante los primeros tres meses.

Cabe señalar que la leche empleada es cruda, es decir no recibe ningún tratamiento térmico, por lo que conserva una microbiota propia. Sin embargo es importante destacar que en las etapas subsecuentes de elaboración existe contacto directo del productor con la cuajada como durante el desmenuzando, y salado; donde ocurre la incorporación de microorganismos al alimento.

2.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Generalidades

La clasificación de las bacterias ácido lácticas (BAL) se realizó en 1919 por Orland Jensen, comprende un diverso grupo de organismos Gram positivos, no móviles, no esporulados, catalasa, reductasa y oxidasa negativos. Su morfología puede ser de coco, bacilo o cocobacilo; se caracterizan por producir ácido láctico. Son anaerobias facultativas, carecen del ciclo de Krebs, por lo que la generación de ATP ocurre

mediante la fermentación de carbohidratos y compuestos relacionados, acoplada a fosforilación a nivel de sustrato. Tienen una composición de bases de ADN de menos de 50% de GC (Vandame *et al.*, 1994; Savadogo *et al.*, 2006).

Las BAL son mesófilas, aunque algunas cepas son capaces de crecer a temperaturas por debajo de 5°C y otras a temperaturas tan altas como 45°C. El pH óptimo de crecimiento de este grupo de bacterias se encuentra en el rango de 4.0 a 4.5, sin embargo algunas especies pueden crecer a pH más bajo hasta 3.2, mientras que otras crecen a pH hasta de 9.6. Las BAL son débilmente proteolíticas y lipolíticas (Vandame *et al.*, 1994).

Los principales géneros que conforman al grupo de las BAL son: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Paralactobacillus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Jay, 2005).

El género *Leuconostoc* se encuentra dividido en tres subgrupos por las secuencias del gen ARNr 16S. Estos tres subgrupos consisten en *Leuconostoc mesenteroides* (*L. carnosum*, *L. citreum*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum*, *L. inhae*, *L. lactis*, *L. kimchii*, *L. mesenteroides*, y *L. pseudomesenteroides*) *Leuconostoc fructosum* (*L. durionis*, *L. ficulneum*, y *L. fructosum pseudoficulneum*) y *Leuconostoc fallax*. (Endo *et al.*, 2008).

Metabolismo

De acuerdo con los productos finales del metabolismo de la glucosa (Figura 3), las BAL se dividen en dos grupos: homofermentativas y heterofermentativas.

Las BAL homofermentativas producen ácido láctico como producto principal o único de la fermentación de la glucosa. Estas bacterias poseen las enzimas aldolasas y hexosas isomerasas, utilizan la vía de Embden-Meyerhof-Parnas para producir 2

moléculas de lactato por molécula de glucosa. Todos los representantes de los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, y *Vagococcus* son homofermentativos (Jay, 2005).

Las BAL heterofermentativas en cambio poseen la enzima fosfocetolasa, la cual convierte hexosas a pentosas por las vías de la hexosa monofosfato o de la pentosa, produciendo cantidades equimolares de lactato y cantidades significantes de productos como acetato, etanol o, CO₂. Todas las especies de *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium* y *Lactosphaera* son heterofermentativas (Jay, 2005).

Funciones

Como producto del metabolismo de las BAL se generan compuestos aromáticos (carbonilos y alcoholes) importantes para el sabor de los quesos tales como; el diacetilo y acetoína a partir de citrato en presencia de azúcares. Asimismo, pueden poseer proteasas extracelulares y ligadas a la pared celular, que hidrolizan parcialmente la caseína en péptidos asimilables, que son degradados subsecuentemente por peptidasas de la membrana y el citoplasma. Sus enzimas proteolíticas son liberadas al queso por lisis celular, cuando son intracelulares. La presencia de enzimas proteolíticas, influye directamente en el sabor del queso (Fox *et al.*, 2000; García *et al.*, 2004).

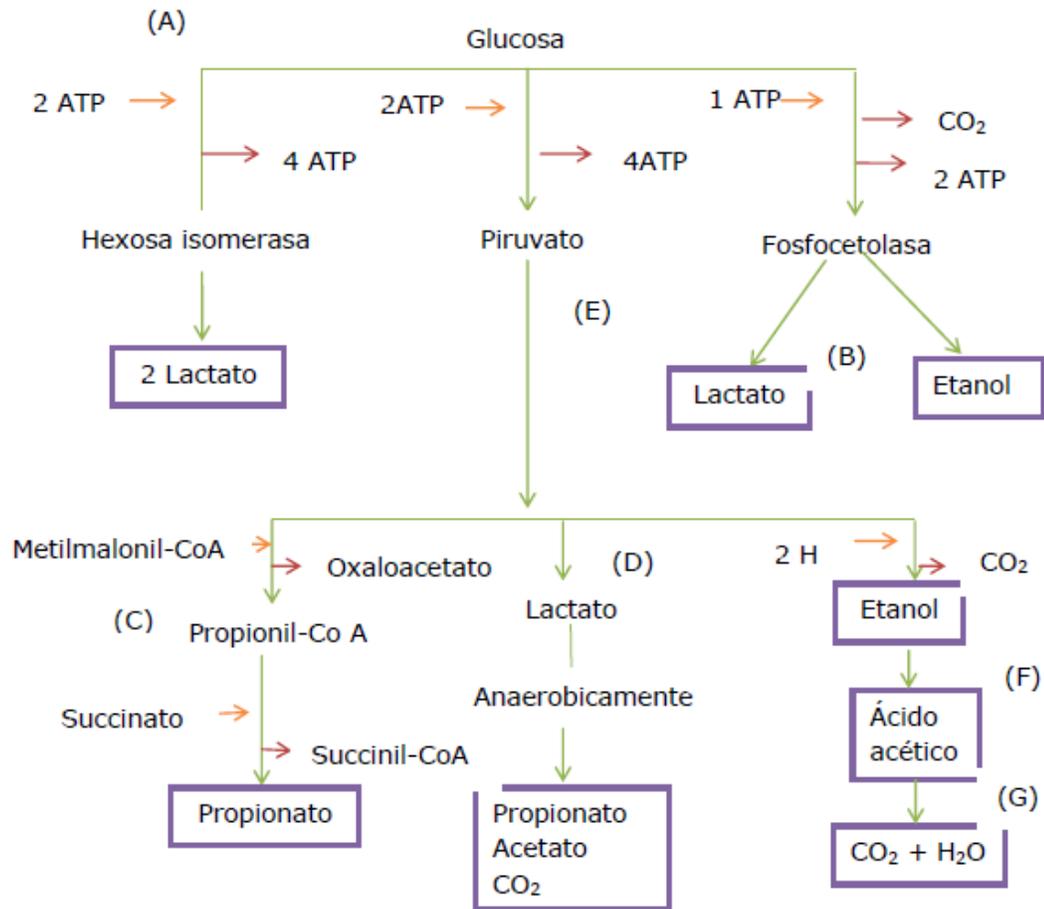


Figura 3. Productos de la vía fermentativa de la glucosa por diferentes microorganismos (A) BAL homofermentativas; (B) BAL heterofermentativas, (C) y (D) Propionibacterium; (F) Saccharomyces spp. ; (G) Acetobacter spp. (Jay, 2005).

El aroma, sabor y la textura de los alimentos lácteos fermentados se debe parcialmente al crecimiento de las bacterias lácticas, que al metabolizar los carbohidratos generan algunos de los siguientes compuestos que aportan características deseables en los quesos: ácido acético, ácido láctico, diacetilo, acetaldehído y, etanol (García *et al.*, 2004).

Es importante señalar que la actividad de las bacterias lácticas limita, y en ocasiones inhibe, el crecimiento de otras bacterias, como las patógenas, tanto por el efecto de la disminución en el pH por la producción de ciertas sustancias inhibitorias como: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, CO₂, bacteriocinas (nisina,

pediocina etc.), productos secundarios como hipotiocianato (Salminen *et al.*, 2004) y sustancias de bajo peso molecular como la reuterina y el ácido piroglutámico o PCA que son producidas por algunas especies.

Importancia de las BAL en alimentos

Las BAL han sido utilizadas durante siglos en fermentaciones por lo que han despertado gran atención para ser utilizadas en la industria de alimentos y farmacéutica (De Vos, 2004), especialmente para la obtención de ácido láctico, componentes saborizantes, espesantes y bacteriocinas, así como al considerable valor nutritivo que pueden aportar a los alimentos y al bajo costo energético de su producción. Cabe resaltar que durante la última década se ha incrementado el número de estudios sobre el rol de que algunas cepas de BAL que pudieran ser empleadas como cultivos probióticos (Topisirovic, 2006).

La importancia biotecnológica de estos microorganismos es muy amplia y está estrechamente ligada a su actividad (Salminen *et al.*, 2004):

- ✓ Producción de acidez
- ✓ Actividad proteolítica
- ✓ Aporte de aromas y sabores
- ✓ Formación de exopolisacáridos
- ✓ Producción de componentes inhibidores
- ✓ Efecto probiótico

Compuestos de interés producidas por BAL

Bacteriocinas

Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza proteínica y poseen actividad antimicrobiana, son eficaces agentes bactericidas contra bacterias Gram positivas (Byong, 2000; García, 2004). Son producidas por muchas especies bacterianas y se

ha generado gran interés en su investigación, debido principalmente a las características de antagonismo contra microorganismos patógenos (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y, *Salmonella spp.*) presentes en alimentos, a la demanda de los consumidores por la producción de alimentos menos procesados, y a la bio-conservación, es decir el uso de bacterias lácticas, sus productos metabólicos o ambos, para mejorar la seguridad y calidad de los alimentos que generalmente no son fermentados (Montville, & Winkowski, 1997).

El crecimiento y actividad de las bacterias ácido lácticas a menudo se ven estimulados por la creación de condiciones selectivas (valores bajos de Eh, a_w , pH, temperatura, bajo contenido de azúcares y altas concentraciones de sal) que retardan el crecimiento y actividad de muchos organismos no deseables durante la fermentación, por lo que su presencia implica un impacto positivo en la vida de anaquel de ciertos alimentos (Byong, 2000).

Ácido láctico

El ácido láctico fue descubierto en la leche cortada por Scheele en 1780 (Kompanje, E.J.O., *et al.*, 2007) y fue considerada como un componente de la leche. En 1789 Lavoisier llamó a este componente de la leche "ácido láctico". En 1857 Pasteur descubrió que no era un componente de la leche, pero sí un metabolito de la fermentación generado por ciertos microorganismos (Ghasemi *et al.*, 2009).

La acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por las BAL, reducen el pH del ambiente y debido a su forma no disociada poseen una actividad inhibidora de bacterias Gram positivas y negativas (Woolford, 1975). Gracias a su naturaleza lipofílica pueden penetrar en la membrana celular y disociarse en el citoplasma, dando lugar a la liberación de iones hidronio (H^+) y el anión correspondiente. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante la bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan la bomba de protones se detiene y provoca el descenso de pH

interno, lo cual causa a su vez la desnaturalización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con su viabilidad (Vásquez, *et al.*, 2009).

Peróxido de hidrógeno

Cuando el oxígeno está presente, las BAL pueden producir peróxido de hidrógeno, el cual genera radicales libres y aniones súper óxido (Salminen, *et al.*, 2004). Estos metabolitos del oxígeno poseen un efecto bacteriostático y bactericida frente a la microbiota láctica y no láctica. Los radicales libres causan peroxidación que ataca los componentes celulares esenciales, lípidos, proteínas y, ADN. La acumulación del peróxido de hidrógeno en un medio de crecimiento puede ocurrir porque las BAL no sintetizan la enzima catalasa (Vásquez *et al.*, 2009).

2.3 Antecedentes en el grupo de trabajo

Se han realizado estudios de diversidad utilizando métodos moleculares dependientes de PCR, lo que ha permitido la identificación de distintos géneros bacterianos: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Marinilactibacillus*, *Vagococcus*, *Virgibacillus* y, *Aerococcus*. Asimismo destacan dos grupos más el de las Gamaproteobacterias y Actinomycetales (Escobar, 2016; Robles, 2014). Adicionalmente mediante hibridación *in situ* se encontró que los tres géneros identificados con mayor frecuencia por la técnica de DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante), (*Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Enterococcus spp.*) representan únicamente el 11% del total de la población bacteriana en una pieza de queso Cotija sin dominancia de alguno de ellos (Escobar, 2016)

Los métodos dependientes de cultivo pueden favorecer la recuperación de determinadas especies que no son necesariamente las más abundantes en una

comunidad microbiana, mientras que las técnicas independientes de cultivo basadas, por ejemplo, en la amplificación de regiones variables ADNr 16S, permite la detección rápida y sensible de microorganismos, cultivables o no, aunque dicho enfoque implica sesgos asociados a la amplificación. El análisis de un metagenoma shotgun permite describir microbiomas complejos sin los sesgos de la amplificación.

El análisis bioinformático del metagenoma del queso Cotija, permitió la identificación de la microbiota completa presente en el alimento tras tres meses de maduración; así como la detección de genes relacionados con su inocuidad y otras funciones metabólicas (Escobar, 2016).

Los resultados obtenidos de la anotación taxonómica mediante la asignación de identidad de marcadores ribosomales y de copia única en dicho trabajo, refieren a géneros y especies bacterianas que pertenecen en su mayoría al filum de los Firmicutes y algunas Actinobacterias y Proteobacterias.

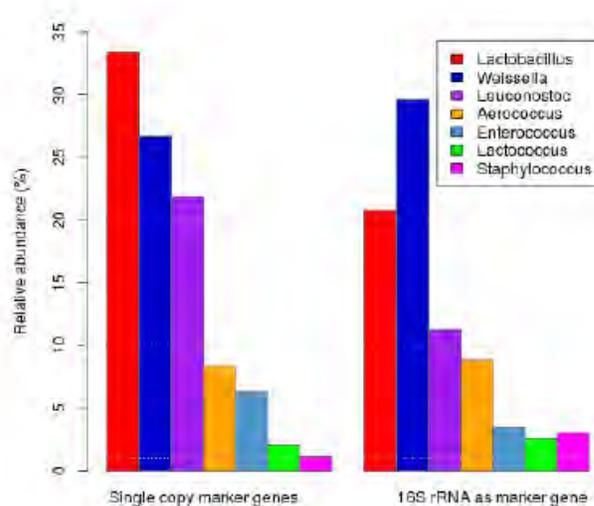


Figura 4. Proporción de las poblaciones dominante y subdominante identificadas en el metagenoma de queso Cotija por dos metodologías distintas. (Escobar, 2016)

Se detectaron tres subpoblaciones en función de su abundancia: Dominantes, que representan >10% de la riqueza relativa (Figura 4 Y 5); subdominantes, que representan menos del 10 y más del 1%; y los pobremente representados <1%. Únicamente tres géneros bacterianos representan >60% de la riqueza total, uno de ellos es *Lactobacillus* (de las especies de abundancia relativa en género), plantarum

(96%), *faricinis* (2%), *brevis* (0.7%), *ramnosus* (0.7%), *casei* (0.5%), *paracasei* (0.05%), *coryniformis* (0.01%) y *buchneri* (0.007%)); y los otros dos, que no se habían detectado con anterioridad en el queso son; *Weissella* (*paramesenteroides* (99.98%) y *cibaria* (0.02%));, y *Leuconostoc* (*mesenteroides* (99.9%), *citreum* (0.03%), *kimchii* (0.0004%) y sp. (0.0004%) (Escobar, 2016).

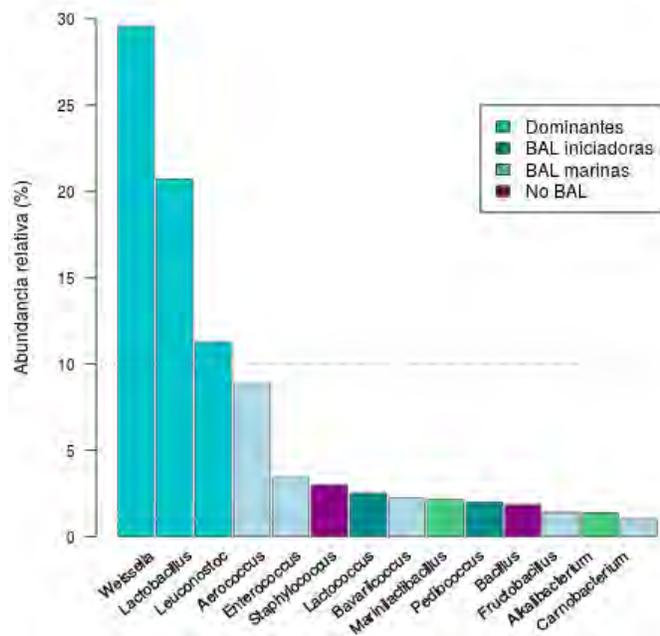


Figura 5. Géneros dominantes y subdominantes encontrados por análisis metagenómico en queso Cotija con tres meses de maduración (Escobar, 2016)

Los tres géneros reportados como dominantes son reconocidos como bacterias ácido lácticas (BAL). Dentro de las BAL se han descrito dos grandes grupos importantes en la elaboración de queso que se han clasificado como BAL iniciadoras (SLAB) y no iniciadoras (NSLAB). En el primer grupo se encuentran aquellas que son productoras importantes de ácido láctico, responsables de la disminución drástica de pH en la primera etapa de la fermentación. Algunos géneros reconocidos por esta característica metabólica son *Lactococcus lactis* y algunas especies de *Lactobacillus* homofermentadores obligados como *L. faricinis*.

Las NSLAB tienen importancia en el proceso de maduración, donde son responsables de la producción de una gama de metabolitos secundarios relacionados con olor y sabor y cuyo metabolismo es principalmente

heterofermentativo (facultativo u obligado) (Chamba & Irlinger, 2004; Felis & Dellaglio., 2007).

Leuconostoc y *Weissella* no son productores importantes de lactato, pero se les consideran como SLAB debido a que contribuyen significativamente a la producción de compuestos de olor y sabor desde el inicio de la fermentación (Björkroth et al., 2006).

Es decir que, de acuerdo a lo reportado por análisis metagenómico a los tres meses de maduración los géneros y especies dominantes tienen metabolismo heterofermentativo y son productores importantes de metabolitos que confieren olor y sabor al alimento. Dichos géneros son miembros del llamado grupo LLPW (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weissella*) debido a que presentan ciertas similitudes fisiológicas y generalmente responden del mismo modo a las condiciones o compuestos inhibitorios dirigidos a bacterias no lácticas. Por esta razón, la mayoría de los medios de cultivo (MRS o rogosa SL) desarrollados para la detección de cualquiera de los géneros del grupo de los LLPW no se consideran selectivos para estos microorganismos (Björkroth, 2006), lo que dificulta el cultivo de estos géneros en medios convencionales cuando forman parte de la misma comunidad microbiana.

2.4 Características de los géneros dominantes en queso Cotija

Lactobacillus

Los lactobacilos son uno de los géneros de bacterias ácido lácticas más importantes y más utilizados en la producción de alimentos fermentados y están ganando cada vez más atención en el área de los probióticos. Los lactobacilos son generalmente más resistentes a las condiciones ácidas, que otras bacterias lácticas, siendo capaces de crecer a valores de pH de hasta 4, lo que les permite mantenerse en crecimiento en fermentaciones naturales aún en etapas tardías. El género

Lactobacillus es heterogéneo, sus miembros pueden tener un contenido de 33-55% de G+C en el ADN. Dentro de este género, encontramos a *Lactobacillus plantarum*, bacilo mesófilo Gram positivo y heterofermentador facultativo que puede encontrarse aislado o en cadenas (Figura 6). Crece en un intervalo de temperatura de 15 a 45 °C y es capaz de producir péptidos antimicrobianos y exopolisacáridos. Si en el medio hay presencia de oxígeno, produce H₂O₂ letal para otras bacterias. Resiste altas concentraciones de lactato y acetato. Cabe resaltar que puede crecer en condiciones de anaerobiosis, mientras que en condiciones de microaerofilia produce alcohol o lactato.

Es una especie heterogénea y versátil que se encuentra en una variedad de nichos ambientales, incluyendo productos lácteos, carne, pescados, y muchos vegetales. *L. plantarum* también se ha encontrado en muchas variedades de quesos frescos y madurados (Bozoudi, D., et al., 2016). Por otra parte se ha confirmado la capacidad de algunas cepas de *L. plantarum* de sobrevivir en condiciones de tránsito gástrico es decir pH ácidos y colonizar el tracto gastrointestinal de los seres humanos y otros mamíferos (Goossens et al., 2005).



Figura 6. Imagen de microscopía electrónica de *Lactobacillus plantarum* disponible en: moblog.whmsoft.net

Weissella

El género *Weissella* fue considerado como tal en 1990, una vez que se logró ver que *Leuconostoc paramesenteroides* era filogenéticamente distinto a *Leuconostoc mesenteroides*. Son bacterias Gram positivas, catalasa negativa, no formadoras de

esporas, heterofermentativas, inmóviles, presentan dos estados morfológicos: bacilar o cocos ovoides (Bjorkroth *et al.*, 2006), (Figura 7).

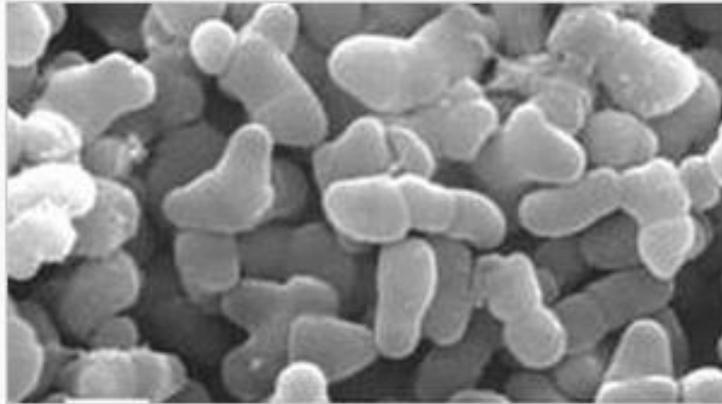


Figura 7. Imagen de microscopía electrónica de *Weissella koreensis* (disponible en: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Weissella_koreensis)

En la actualidad hay más de 18 especies de este género, algunas de ellas son: *Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica*, *Weissella kandleri*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella thailandensis*, y *Weissella viridescens*. *Weissella paramesenteroides* es una de las especies predominantes en verduras frescas y también juega un papel importante en el ensilaje (Dellaglio *et al.*, 1984; Dellaglio & Torriani., 1986). *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica* y *Weissella viridescens* se han asociado comúnmente con carne o productos cárnicos (Niven *et al.*, 1957, Milbourne , 1983; Collins *et al.*, 1993) mientras que el hábitat natural de *Weissella kandleri* es desconocido (Hammes & Vogel., 1995). Por su parte *Weissella confusa* se ha aislado de una variedad de fuentes tales como: caña de azúcar, jugo de zanahoria, leche cruda y aguas residuales (Björkroth *et al.*, 2002), embutidos fermentados (Collins *al.*, 1993), y alimentos típicos de Malasia (Leisner *et al.*, 1999). De igual manera se ha visto presente en el intestino humano como parte de la microbiota normal (Nam *et al.*, 2002).

Dentro del género *Weissella* se han investigado algunas especies por su potencial como productor de bacteriocinas mostrando inhibición contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (Chavasirikunton *et al.*, 2006). Se han reportado cepas capaces de inhibir la adherencia de *Helicobacter pylori* a las células del intestino.

Leuconostoc

El género *Leuconostoc* está compuesto por microorganismos Gram positivos, catalasa negativos, con morfología cocoide irregular (Figura 8). Este organismo puede ser identificado erróneamente como *Lactobacillus*, *Streptococcus* (en particular el grupo *viridans*) *Pediococcus* o incluso *Enterococcus* ya que posee propiedades bioquímicas comunes a estos géneros. A diferencia de otras bacterias Gram positivas, posee un importante marcador fisiológico, relacionado con una resistencia intrínseca a vancomicina.

Filogenéticamente, el género *Leuconostoc* pertenece al filum de los *Firmicutes*, clase *Bacilli*, y orden *Lactobacillales*. *Leuconostoc* está estrechamente relacionado con los géneros, *Oenococcus* y *Weissella* y juntos se les conoce comúnmente como el “grupo *Leuconostoc*” de las BAL.

Particularmente *Leuconostoc pseudomesenteroides* está ampliamente presente en alimentos fermentados, como la carne, los granos de cacao, el kimchi (Lee, K.W. *et al.*, 2016) las aceitunas, el vino y algunos productos lácteos (Nascimento MDAS, *et al.*, 2008). En la tecnología de productos lácteos, las cepas de *Leuconostoc pseudomesenteroides* se encuentran como cultivos iniciadores en asociación con los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Su presencia es beneficiosa en numerosos aspectos tecnológicos.

Leuconostoc pseudomesenteroides posee un metabolismo heterofermentativo, donde la producción de gas (CO₂) permite la apertura del queso y la colonización de *Penicillium* en el queso Roquefort de pasta azul. También produce dextranas que modifican la textura y la percepción del gusto mediante el aumento de viscosidad, dando estabilidad a los productos finales.

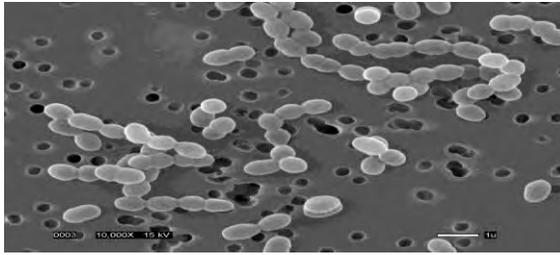


Figura 8. Imagen de microscopía electrónica de *Leuconostoc mesenteroides*, disponible en: <http://genome.jgi.doe.gov/leume/leume.home.html>

Esté género produce compuestos aromáticos, tales como diacetilo, acetaldehído, los cuales contribuyen a las propiedades organolépticas de muchos productos lácteos (Cogan *et al.*, 1981)

Por otro lado *Leuconostoc mesenteroides* es un heterofermentador obligado, crece en un intervalo de temperatura de 18 a 25 °C. En medio ricos en sacarosa produce polisacáridos extracelulares tales como dextranos y levanos (Chellapandian *et al.*, 1998; Torres Rodriguez, *et al.*, 2014). En condiciones de pH bajo, y alta concentración de sal y baja actividad acuosa *L. mesenteroides* reduce la tasa de utilización de acetaldehído y la formación de etanol y acetato.

Particularmente esta especie presenta una resistencia intrínseca a la vancomicina (antibiótico desarrollado en los años 50, descrito como un antimicrobiano activo frente a grampositivos, particularmente dirigido a estafilococos productores de β -lactamasa).

2.5 Identificación de bacterias por secuenciación del gen ribosomal 16S

El gen ribosomal 16S como marcador filogenético

Los ribosomas son moléculas presentes en todos los organismos vivos, el material que contiene se utiliza como cronómetro molecular debido a que la estructura primaria de sus dos subunidades ARNr 16S y 23S, poseen una combinación particular de regiones conservadas, variables e hipervariables (Brown *et al.*, 2002; Clarridge *et al.*, 2004; Yarza *et al.*, 2004). El gen 16S del ARNr es el más ampliamente utilizado para la identificación de especies bacterianas, su uso como

marcador taxonómico es adecuado para relacionar filogenéticamente a los microorganismos, debido a que dichas secuencias han sido compiladas en grandes bases de datos como GenBank alojado en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y que contenía aproximadamente 90 000 secuencias (Das *et al.*, 2014; Clarridge *et al.*, 2004).

Este gen está compuesto por aproximadamente 1500 nucleótidos y contiene nueve regiones hipervariables (V1-V9) que muestran una considerada diversidad entre las secuencias de diferentes especies de bacterias, las regiones V1-V3 son las de mayor utilidad en la identificación taxonómica ya que en las otras regiones existe un alto grado de conservación en las secuencias (Cai *et al.*, 2006; Chakravorty *et al.*, 2007).

El gen 16S ARNr (Figura 9) contiene regiones conservadas en todos los procariontes que son ideales para el diseño de iniciadores universales, útiles en la PCR, la secuenciación, y el alineamiento de secuencias. La molécula consta de aproximadamente 50 dominios funcionales. A medida que el número de dominios se incrementa, el impacto de los cambios selectivos es menor en las relaciones filogenéticas. Por estas razones, entre otras, es considerado un cronómetro molecular (Patel, 2001).

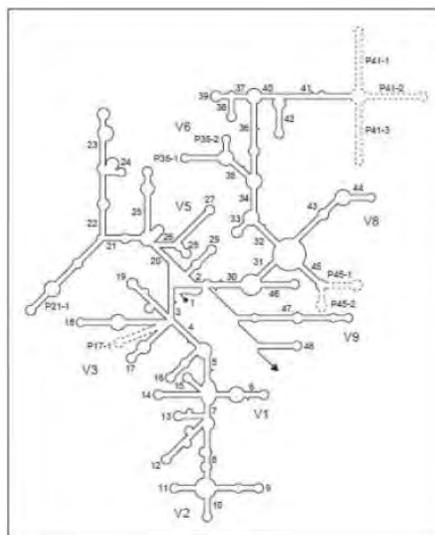


Figura 9. Estructura secundaria del ARN 16S (Rodicio y Mendoza, 2004)

Reacción de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por las siglas en inglés) es, sin lugar a dudas, la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde. En procariontes se han encontrado al menos 12 proteínas involucradas en la replicación. Estas proteínas actúan en diferentes actividades, como: 1) la identificación del sitio de origen de la replicación; 2) el desenrollamiento de la doble hélice; 3) la estabilización de la estructura desenrollada; 4) la generación de cadenas iniciadoras complementarias con un extremo 3' libre que sirve de iniciador para que la ADN polimerasa comience su actividad de síntesis; 5) el avance de la bifurcación replicadora por desenrollamiento; 6) los pasos finales del ensamblaje de dos cadenas complementarias; 7) la identificación de los sitios de terminación y 8) el superenrollamiento de las dos nuevas moléculas de ADN (Figura 10). Sin embargo, la enzima más importante en la replicación es la polimerasa del ADN, comúnmente conocida como ADN polimerasa, porque es la encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN (Bohinski 1991).

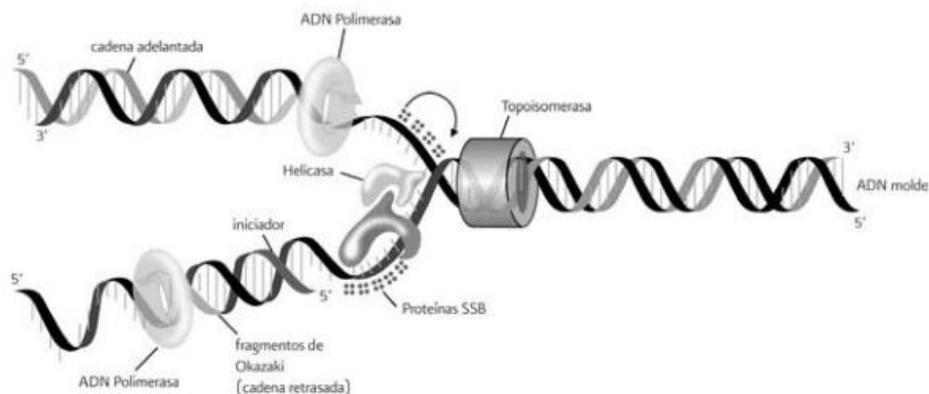


Figura 10. Proceso de replicación del ADN a nivel celular. Horquilla de replicación del ADN con algunas de las proteínas más importantes que participan el proceso. La molécula original de ADN sirve de molde para que la ADN polimerasa genere una nueva copia de un fragmento de ADN. La ADN polimerasa celular requiere la presencia de un iniciador para llevar a cabo el proceso de replicación. Modificada de www.biologia.edu.ar/adn/imagenes/ch8f20.gif.

En la PCR se simula en un tubo lo que ocurre naturalmente durante la replicación. La síntesis de nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo mezclando: el ADN que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar, la polimerasa, los iniciadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo 3' libre para que inicie la replicación), desoxinucleótidos (dNTPs), cloruro de magnesio ($MgCl_2$) u otro cofactor necesario para que trabaje la polimerasa y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis (Espinosa 2007). Esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas (ciclo de PCR). Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se disminuye la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite el alineamiento de los iniciadores. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación.

Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes (Figura 11), dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado (Espinosa, 2007).

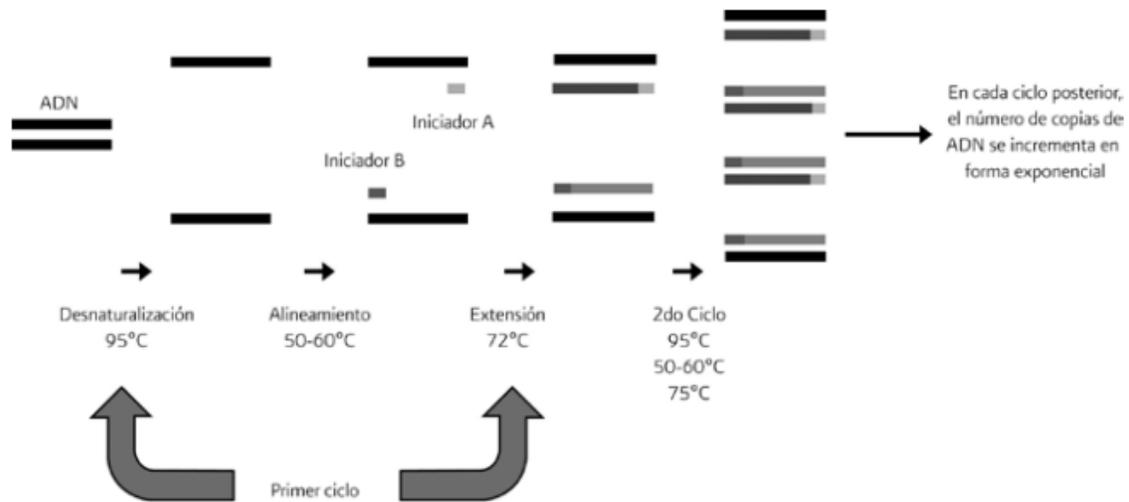


Figura 11. Amplificación de ADN mediante PCR. Un ciclo de amplificación consta de tres etapas: separación de las hebras de ADN (desnaturalización), unión de los iniciadores a una secuencia complementaria del ADN molde (alineamiento) y la síntesis semiconservativa de una nueva cadena por adición de nucleótidos debido a la acción de la ADN polimerasa (extensión). Cada una de las etapas está determinada por una temperatura. Teóricamente el proceso permite generar en 30 ciclos de amplificación más de dos billones de copias de ADN a partir de una sola molécula. Modificada de https://www.u-cursos.cl/ingenieria/2009/2/BT51A/1/material_docente/objeto/244484.

La PCR surgió en 1971 cuando Gobind Khorana describe la técnica al explicar la replicación de un fragmento de ADN usando dos iniciadores (Kleppe *et al.*, 1971). Pero fue en 1983 cuando Kary Mullis y sus compañeros de la compañía californiana Cetus Corporation la llevaron a cabo por primera vez mientras trabajaban en la fabricación de oligonucleótidos y en el uso de iniciadores para la secuenciación de ADN. Mullis y colaboradores usaron dos iniciadores que se alineaban con cada una de las hebras del ADN, adicionaron ADN polimerasa I de *Escherichia coli* y nucleótidos trifosfatados. Como resultado obtuvieron la replicación exponencial del fragmento de ADN flanqueado por los iniciadores (Mullis y Faloona 1987). El proceso original era poco eficiente ya que utilizaba grandes cantidades de ADN polimerasa que se desnaturizaba en cada ciclo en el paso de incremento de temperatura para desnaturizar la doble hélice y necesitaba de supervisión durante todo el proceso (Mullis y Faloona, 1987). Sin embargo el elemento que mejoró la técnica fue el descubrimiento de las ADN polimerasas termoestables y termoactivas que no pierden su actividad con temperaturas altas. En 1976 se aisló la primer polimerasa

termoestable conocida como Taq polimerasa, a partir de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en ambientes acuáticos con temperaturas cercana a los 100 °C. Esta nueva enzima permitió la simplificación y automatización de la PCR, sin necesidad de adicionar polimerasa en cada uno de los ciclos (Saiki *et al.*, 1988).

Secuenciación

Existen diferentes técnicas para secuenciar, por ejemplo: la química, la enzimática y la automática.

La química fue diseñada por Alan Maxam y Walter Gilbert y consiste en dividir el ADN en cuatro muestras, que son tratadas con agentes químicos, los cuales permiten la ruptura del ADN de manera específica en una base; bajo estas condiciones solo unos pocos nucleótidos del fragmento pueden afectarse. Estos fragmentos se marcan con radiactividad y se auto radiografían.

En el método enzimático de Fred Sanger (1977) el ADN a ser secuenciado se utiliza como patrón de referencia para producir una síntesis *in vitro*, mediante una polimerasa y una réplica de ADN que inicia la síntesis del ADN siempre en el mismo sitio. El punto crítico es el uso de trifosfato de dideoxirribonucleósido: la deoxirribosa no cuenta con el grupo 3-OH, de tal forma que cuando el nucleótido es incorporado a la cadena de ADN, se bloquea la adición del siguiente nucleótido, por lo que cada molécula de ADN sintetizada va a terminar aleatoriamente en dicho nucleótido. Esta síntesis se lleva a cabo en cuatro muestras; en cada muestra se incorpora un dideoxinucleósido con una base diferente (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) y los otros tres deoxinucleótidos normales. Los fragmentos sintetizados durante el proceso van a terminar en sitios diferentes de la cadena del ADN, generando una escalera de moléculas de ADN que pueden ser detectadas por auto radiografía. Las cuatro muestras se corren en electroforesis en líneas paralelas para determinar el orden de los nucleótidos, identificando la secuencia de ADN que será complementaria al ADN que sirvió de modelo para la síntesis (Figura 12).

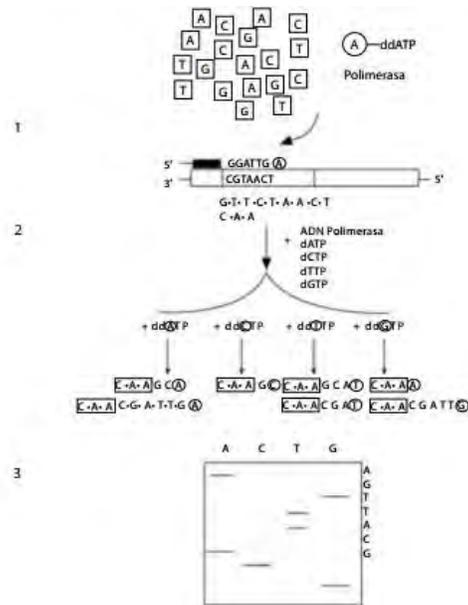


Figura 12. Método de secuenciación enzimática de ADN. 1) Síntesis en presencia del ADN de interés, polimerasa, un fragmento de ADN como iniciador, nucleótidos y dideoxinucléotidos atípicos; 2) Síntesis por separado para cada nucleótido, generando fragmentos de ADN con el dideoxinucléotido incorporado; 3) separación de los fragmentos en un gel para identificar la secuencia (Rentería M., 2007)

Recientemente se ha introducido la secuenciación automática que utiliza la reacción de Fred Sanger pero con fluorescencia en vez de radiactividad, que se detecta por medio de un láser. Cada emisión fluorescente es transmitida como una señal directamente a la computadora donde un programa la interpreta y la codifica como un nucleótido particular (Swofford *et al.*, 1996; Griffiths *et al.*, 1996). La captura de secuencias se hace más rápida debido a que incorporan programas que leen los nucleótidos directamente desde el gel (Figura 13). Entre las principales ventajas que tiene la secuenciación de ADN es su alta reproducibilidad y que es codominante; su mayor limitante es su alto costo pero es la mejor alternativa entre los métodos con isótopos radiactivos (Rentería, 2007).

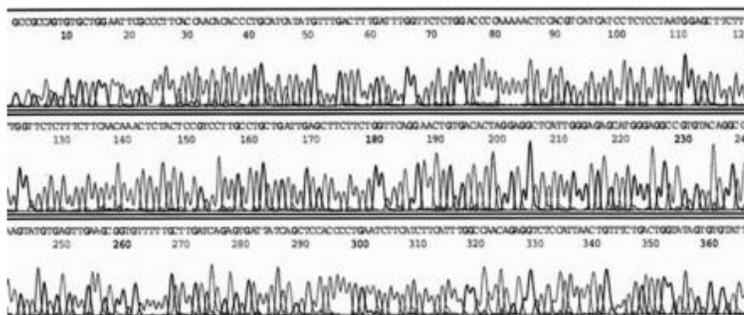


Figura 13. Ejemplo de patrones de secuenciación automática (Rentería M., 2007).

Análisis taxonómico de secuencias

La secuencia consenso obtenida de la secuenciación se compara con bases de datos de secuencias ribosomales de acceso público o privado, con el objetivo de identificar la cepa de la que proviene. En el caso particular de dicho trabajo las secuencias consenso obtenidas se compararon con las presentes en la base de 16S Ribosomal RNA sequences (Bacteria and Arquea) del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Análisis filogenético

La finalidad de los análisis filogenéticos es estimar una filogenia es decir la relación de parentesco entre especies o taxones en general por medio de la evidencia de distancia evolutiva contenida en las diferencias y similitudes de bases entre secuencias particulares de sus genomas (Martínez L., 2007).

Un árbol filogenético es una estimación matemática usada para representar la historia evolutiva (relaciones de ancestro-descendiente) entre un grupo de secuencias u organismos. Dicho patrón de relaciones históricas es la estimación de la filogenia o árbol evolutivo. (Vinuesa, 2008). Existen diferentes métodos para la construcción de árboles basados en distancias fenotípicas, los cuales se construyen en base a la distancia entre los caracteres observados, como ejemplo de ello tenemos los métodos de UPGMA y Neighbor-Joining (NJ). Este último es puramente algorítmico; y se basa en encontrar vecinos que minimizan la longitud total del árbol. El método de NJ fue propuesto en 1987 por Saitou y Masatoshi Nei (Sato & Nei,

1987), y consiste en generar un único árbol filogenético, el cual no necesariamente será el árbol verdadero. Como primer paso se da la unión de dos *neighbors* (secuencias) que tengan la menor distancia genética. Luego, éste par inicial se considera como una sola entidad, y se busca la siguiente secuencia que tenga la menor distancia genética con éste. El procedimiento continúa hasta unir todas las secuencias al “árbol filogenético” En el caso de secuencias de ADN, la distancia genética entre dos secuencias se calcula en base al número total de sustituciones de bases nitrogenadas (Sato & Nei, 1987). Para seleccionar las secuencias que tengan menor distancia genética, lo que en la práctica es escoger las secuencias más parecidas, es necesario construir una matriz estándar de distancias entre todas las posibles combinaciones de terminales. Entonces se construye el “árbol filogenético” agregando secuencias tomando como información los valores de la matriz de distancias (Sato & Nei, 1987).

III. JUSTIFICACIÓN

Se han identificado y aislado especies de bacterias que participan en las diferentes etapas de elaboración del queso Cotija, las cuales pueden provenir de las materias primas, o bien del ambiente. El análisis del metagenoma del queso elaborado por Escobar en 2016, amplió el panorama de los géneros bacterianos encontrados con anterioridad por otros métodos, lo que permitió determinar que aquellos géneros identificados por métodos dependientes de PCR y, en algunos casos aislados, no eran los que presentaban mayor abundancia relativa en el queso Cotija. Lo anteriormente expuesto, nos lleva a pensar que no se han encontrado las condiciones adecuadas para favorecer el desarrollo de los géneros dominantes: *Lactobacillus*, *Weissella* y *Leuconostoc*.

IV. HIPÓTESIS

Si fue posible identificar mediante el análisis del metagenoma a los géneros con mayor abundancia relativa, podremos aislarlos en medios de cultivo al favorecer su crecimiento en condiciones apropiadas (presencia de oxígeno, temperatura y pH).

V. OBJETIVOS

- 👤 Aislar e identificar cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Weissella* y *Leuconostoc* mediante la optimización de una técnica de cultivo que favorezca su crecimiento.

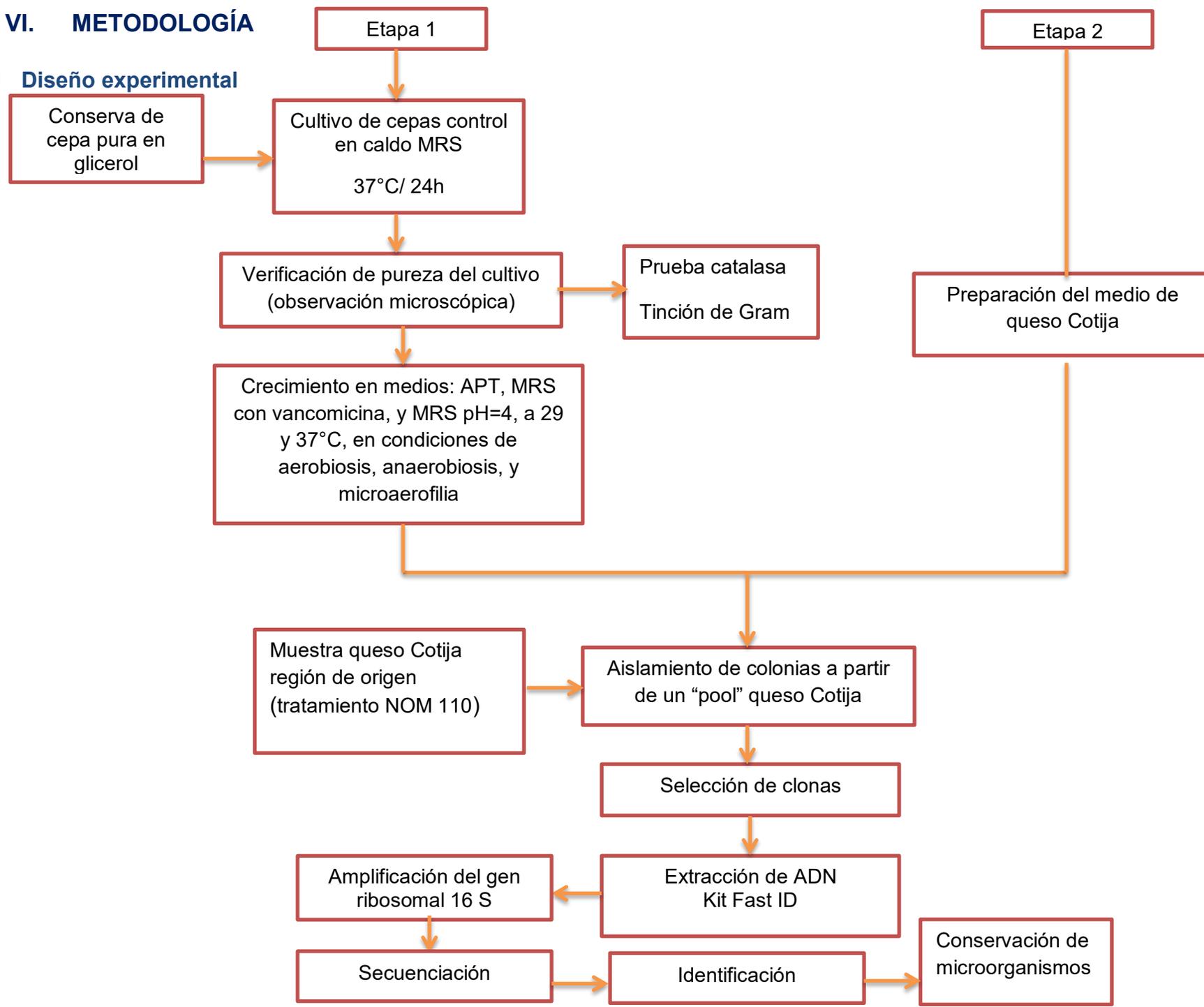
- 👤 Aislar bacterias a través de la utilización de medios comerciales (MRS) variando condiciones de pH, temperatura y oxígeno.

- 👤 Elaboración de un medio a partir de un extracto acuoso de queso Cotija donde se evaluará el posible crecimiento de los géneros buscados.

- 👤 Identificación de dichas cepas mediante técnicas moleculares, específicamente la secuenciación del gen ribosomal 16 S, con la posterior comparación de secuencias contra las bases de datos públicas.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Diseño experimental



6.2 Descripción de cepas control

Para el desarrollo de éste trabajo se contó con las siguientes cepas de referencia: *Enterococcus faecalis* (aislada de queso Cotija (Olvera, 2013)), *Weissella paramesenteroides* (aislada de atole agrio donada por la Dra. Carmen Wachter del L-324, Conj. E, Facultad de Química), *Lactobacillus plantarum* (cepa de colección) y *Leuconostoc mesenteroides* (cepario Facultad de Química).

A cada una de estas cepas se efectuaron dos pruebas fenotípicas, tinción de Gram (Anexo 1) y prueba de catalasa.

6.3 Cultivo de bacterias

Evaluación de crecimiento en medios comerciales

Se evaluó el crecimiento de las cuatro BAL de manera cualitativa, dependiendo del grado de turbidez observado se le asignó un valor arbitrario de 5 a 15, a dos temperaturas 37 y 29°C, en tres medios líquidos: APT (Difco), MRS (de Man, Rogosa, Sharpe, (OXOID)) con vancomicina y MRS pH=4. Se probaron tres condiciones de oxigenación en aerobiosis colocando los medios líquidos en agitación a 250 rpm (incubadora INNOVA 4000, New Brunswick), anaerobiosis en cultivo en estático con cubierta de cera y microaerofilia en cultivo en estático con cubierta de agar (Agar Bacto Agar; BD-DIFCO) al 1% p/v.

Preparación del medio de queso Cotija y cultivo de cepas control

Adicionalmente se preparó un medio a partir de un extracto acuoso proveniente de Queso Cotija, donde también se registró el crecimiento de las cepas mencionadas anteriormente.

Para la obtención de dicho extracto se mezclaron 10 g de queso y 30 mL de agua estéril, pH=7, precalentada a 50 °C, se incubó durante 30 min a la misma

temperatura; posteriormente se decantó y se filtró con gasa, enseguida se realizó un paso de homogeneizado con Ultraturax a 8500 rpm durante 5 min (Janke and Kunkel Ultraturax T25.) y se centrifugó a 7500 rpm durante 5 min (Biofuge Primo R, Haereus). El sobrenadante se filtró con papel filtro (2 veces) y se esterilizó por microfiltración en Equipo de filtración por membrana de Merck Millipore con membrana de 0.22 micras (Membrane Filters; Merck Millipore). El extracto acuoso de queso Cotija obtenido (aproximadamente 50 mL) se mezcló con una solución de agar al 2 % (p/v) (esterilizado previamente) y se incubó a 37 y 29 °C en estufa estática durante 10 días con el fin de verificar su apropiada esterilización.

6.4 Procedencia de los quesos utilizados en el pool

Se utilizaron 19 muestras de queso Cotija elaborados por diferentes productores, almacenados a -70°C en el laboratorio. Las muestras eran provenientes de 6 municipios de la zona productora de Cotija Región de Origen (Quitupán, Valle de Juárez, Jilotlán y Sta. Ma. Del Oro en Jalisco, y Cotija y Tocumbo en Michoacán).

Todos los quesos seleccionados cumplen con los siguientes criterios: $a_w \leq 0.91$, cuenta de coliformes fecales ≤ 50 NMP y cuenta de coliformes totales ≤ 360 UFC/g; además cumplen con la Norma Mexicana para queso Cotija (NMX-F-735-COFOCALEC-2011).

Particularmente esta norma no especifica las cuentas mínimas de coliformes fecales para este producto, debido a ello se tomó como referencia la Norma Oficial Mexicana de especificaciones sanitarias para quesos frescos, madurados y procesados obtenidos a partir de leche estandarizada y pasteurizada (NOM-243-SSA1-2010), la cual indica que para quesos madurados la cuenta de coliformes fecales debe ser <50 NMP/g.

Los quesos que no cumplieron con estas especificaciones fueron descartados debido a que las altas cuentas podrían indicar prácticas deficientes de higiene en la elaboración del producto, lo que se relaciona con incumplimiento de las

especificaciones de la Norma y Reglas de uso para Queso Cotija auténtico (Escobar, 2016).

Otro criterio microbiológico que se tomó en cuenta fue la ausencia de los siguientes patógenos cuya determinación se llevó a cabo por cuenta en placa y por PCR tiempo real (RT-PCR): *S. aureus* (Salto, 2013); *Salmonella spp.* (Hernández, 2012); *Listeria monocytogenes* (Becerra, 2013); *Brucella abortus* (Torres, 2013); *E. coli enterotoxigénica* y *E. coli O157* (Mejía, 2013).

Las muestras seleccionadas para realizar el pool poseen los siguientes códigos: QC-8, QC-9, QC-10, QC-14, QC-20, QC-21, QC-22, QC-23, QC-24, QC-25, QC-29, QC-31, QC-32, QC-34, QC-35, QC-36, QC-37, QC-38, QC-39.

De las muestras presentes se hizo un pool pesando 15g de cada queso previamente homogeneizado y la mezcla se almacenó a 4°C hasta su uso de acuerdo con la NOM 110 “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”. Los inóculos se prepararon pesando 15 g del pool de quesos en la campana de flujo laminar dentro de bolsas para Stomacher (Seward Laboratory, London, UK); se adicionaron 40 mL de agua peptonada estéril (0.85% NaCl p/v y 1% Peptona de caseína p/v) y se homogenizó en Stomacher 400 circulator (Seward Laboratory, London, UK), durante 2 minutos a alta velocidad en condiciones de anaerobiosis (adicionando clorhidrato de cisteína) y aerobiosis durante 24 h a 29°C. Transcurridas 24 h se efectuaron diluciones hasta 10^{-3} en agua peptonada estéril; tomando de cada tubo 1 mL para su inoculación mediante estría por agotamiento en los medios de cultivo.

6.5 Aislamiento de colonias a partir de una mezcla de quesos Cotija

Para la obtención de colonias se sembró en medios líquidos MRS y Extracto acuoso de queso Cotija bajo las condiciones mostradas en la [Tabla 1](#).

Tabla 1. Condiciones de cultivo a evaluar para el aislamiento de los géneros de interés.

Formulación base	pH	Incubación
MRS	4	Agitación*
MRS	4	Estático**
Queso	4	Agitación
Queso	4	Estático
Queso	Sin modificar	Agitación

*En Incubadora INNOVA 4000, New Brunswick a 250 rpm

** Adicionando clorhidrato de cisteína al 0.1% (p/v)

En 2009 Martínez identificó levaduras en muestras de queso Cotija de al menos tres meses de maduración mediante métodos moleculares dependientes e independientes de cultivo. Debido a ello, se preparó una solución stock de benzoato de sodio (0.1 g/mL), el cual se adicionó a los medios de cultivo líquidos con el fin de inhibir su crecimiento.

Cada uno de los medios de cultivo de la [Tabla 1](#) en líquido y sólido se inocularon con 1 mL de muestra proveniente de la mezcla de quesos preparada como se describe en la sección 5.4. Las cajas se incubaron en estufa estática a 29 °C y en jarra de anaerobiosis cuya capacidad era de 2.5 L (Anaerojar; OXOID) a la misma temperatura; se monitorearon cada 2 días hasta cumplir diez. De aquellas cajas donde se presentó crecimiento, se eligieron colonias que se encontrarán aisladas con base en las características macroscópicas para cada género de BAL ([Tabla 2](#))

Tabla. 2 Características macroscópicas para cada género de BAL.

Género	Características macroscópicas
<i>Leuconostoc</i>	Colonias de forma circular, superficie lisa, translúcida, color crema, consistencia viscosa, de gran tamaño, elevación convexa y borde entero (Sais, H. & Sotolongo, R. 1976; Mora, Z.

	1995)
<i>Lactobacillus</i>	Colonias de aspecto circular, color blanco, de elevación convexa, opacas y borde entero (Kandler, O. & Weiss, N. 1992).
<i>Weissella</i>	Colonias de aspecto circular, color crema o blanco, de elevación convexa, consistencia viscosa y borde entero (Collins, <i>et al.</i> , 1993).
<i>Enterococcus</i>	Colonias de aspecto circular, incoloras a grises, que tienen de 2-3 mm de diámetro, elevación convexa y borde entero (O'Leary, M., 1990)

6.6 Análisis con métodos moleculares

Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN de las cepas control y de algunas de las colonias aisladas del queso que se sospechaba pudieran ser de los géneros dominantes de interés de acuerdo a su morfología microscópica y de colonia.

Para ello se partió de un cultivo de 100mL en caldo MRS de 8h. Para separar las células del medio se centrifugó a 10,015 x g durante 10 min a 4°C (Biofuge Primo R, Haereus). Después se realizaron dos lavados con solución salina isotónica (0.85% p/v, pH 7) y se recuperaron las células centrifugando en las mismas condiciones. Se utilizó el kit Fast ID Genomic DNA Extraction (Genetic ID, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. La extracción de ADN se basa en la liberación de material genético, mediante el uso de detergentes y de enzimas que rompen y digieren las proteínas de la membrana celular. El ADN se une por afinidad a una membrana de sílica y se eliminan contaminantes con lavados con etanol al 70 % para ser finalmente eluído con buffer Tris-EDTA (Genomic DNA Extraction Kit, Manual)

Una vez obtenido el ADN puro de cada cepa se cuantificó por absorbancia a 260 nm utilizando el espectrofotómetro para microplacas EPOC (Bio Tek, USA) y una placa Take 3 micro-volume (Bio Tek, USA).

Reacciones de PCR

El ADN, se sometió a una reacción de amplificación del ARNr del 16S por PCR usando los cebadores fD1 y rD1, empleados para la mayoría de las eubacterias (Weisburg, *et al.*, 1991)

Tabla 3. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación del gen ribosomal 16S en eubacterias (Weisburg, *et al.*, 1991)

Cebador	Secuencia (5´ - 3´)
fD1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rD1	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50µL usando buffer 1X + dNTP's (0.2 mM), cebadores fD1 y rD1 (0.2 µM), 100 ng de ADN de cada muestra y 1 U de Pfu polimerasa.

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento o hibridación a 51.6°C durante 30 s, polimerización o extensión a 72 °C durante 3 min y una extensión final a 72 °C durante 10 min.

En la siguiente tabla se enlistan las concentraciones de todos los reactivos empleados para la PCR, considerando un volumen de 50 µL finales por reacción.

Tabla 4. Concentración de reactivos para la PCR

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer	10X	1X	5
Datp	100 mM	0.2 mM	0.1
Dctp	100 mM	0.2 mM	0.1
Dgtp	100 mM	0.2 mM	0.1
dTTP	100 mM	0.2 mM	0.1
Primer fD1	100 µM	0.2 µM	1
Primer rD1	100 µM	0.2 µM	1
Pfu polimersa	2.5 U/µL	1 U	0.4
ADN	X ng/reacción	100ng/reacción	X µL
Agua	-----	-----	cbp 50 µL

Análisis de amplicones

El tamaño del amplicón esperado después de la reacción de PCR fue de 1500 bp. Después de la amplificación, los productos de PCR se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). La tinción se realizó con bromuro de etidio 0.1% y los geles se examinaron en un transiluminador (Hoefer UVTM, USA).

Para la purificación de amplicones se utilizaron los siguientes kits: QIAquick Gel Extraction Kit de Qiagen, GeneJET Gel Extraction Kit de Thermo Fisher Scientific (purificación de banda) y Kit "DNA Clean & Concentrator^{TM-5}" de Zymo Research. La razón por la cual se hizo uso de los tres diferentes kits, fue debido a que no se contaba con las columnas suficientes.

Enseguida se cuantificó la concentración de los amplicones puros utilizando el espectrofotómetro para micro placas Epoch (Bio Tek, USA) y una placa Take 3 (Bio Tek, USA).

Los productos purificados (10 ng de amplicón purificado en un volumen aproximado de 20 μ L) de PCR se mandaron a secuenciar a MACROGEN Co., Seúl, Corea.

Identificación

Las secuencias se analizaron por el algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), herramienta que realiza alineamientos locales de la secuencia problema contra las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information). Para ello se utilizó esta base de datos: 16S ribosomal RNA Sequences (Bacteria and Archaea).

6.7 Análisis filogenético

La relación filogenética de las secuencias ribosomales fue inferida con el programa MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Versión 7.0; Kumar, S. *et al.*, 2015) usando el método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987). El árbol consenso obtenido fue inferido por bootstrapping de 10, 000 remuestreos y representa la relación entre las cepas analizadas. 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 (Felsenstein, 1985). La distancia de la relación fue calculada usando el método de Tamura-Nei.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización fenotípica de cepas control

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas y su comparación con aquellas de cultivos tipo. Es por eso que en el proceso de identificación bacteriana tradicional se seleccionan pruebas rápidas y sencillas que permiten situar a las bacterias de manera provisional en grupos. Entre algunas pruebas están: tinción de Gram, prueba de catalasa, oxidasa, fermentación de diferentes azúcares glucosa, producción de esporas, crecimiento en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis y movilidad entre otras (Fernández, *et al.*, 2010).

Puesto que era necesario conocer la morfología de cada género y asegurar la pureza del cultivo, se realizó la caracterización micro y macroscópica de cada cepa usada como control.

A continuación se muestran las tinciones de Gram para las cepas control (Figura 14-16). Todas las imágenes fueron obtenidas con microscopio óptico, con el objetivo de inmersión (1,000X).

En la Tabla 5 se muestra un resumen de las características microscópicas de cada cepa control.

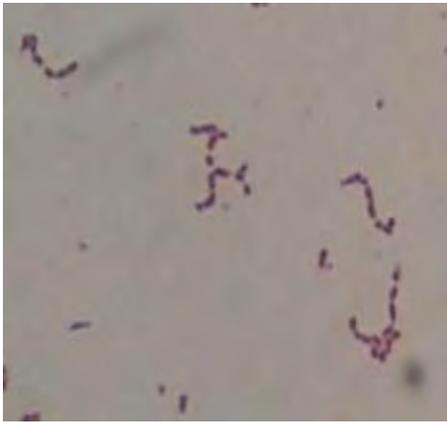


Figura 14. Tinción de Gram para *L. mesenteroides*

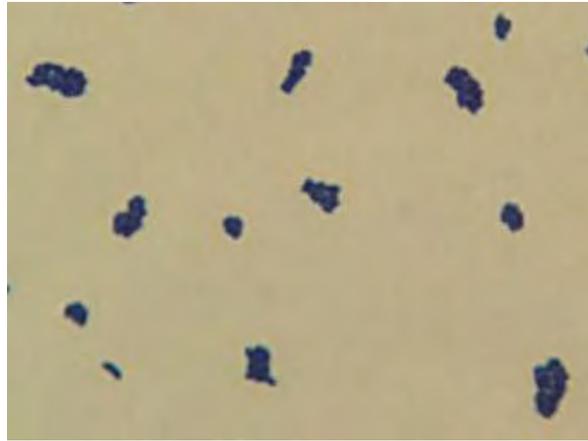


Figura 15. Tinción de Gram para *W. paramesenteroides*

Figura 16. Tinción de Gram para *Lb. plantarum*



Tabla 5. Morfología microscópica característica de las cepas usadas como control.

Microorganismo	Morfología microscópica	Prueba de la catalasa.	Referencia
<i>L. mesenteroides</i>	Cocos Gram +, agrupado en parejas o en cadenas cortas.	Negativa	Bjorkröth & Holzapfel, 2006
<i>W. paramesenteroides</i>	Presenta dos estados morfológicos: bacilar o cocos ovoides Gram +, agrupados en racimos.	Negativa	Bjorkröth & Holzapfel, 2006
<i>Lb. plantarum</i>	Bacilo Gram + que puede encontrarse aislado o en cadenas.	Negativa	Coeuret, V. et al., 2003
<i>E. faecalis</i>	Cocos Gram +, agrupados en pares o en cadenas.	Negativa	Giraffa, 2003

Como puede observarse en las imágenes presentadas anteriormente la morfología microscópica coincide con lo reportado en la literatura para cada género; de la misma manera todas las cepas control dieron negativo para la prueba de catalasa.

7.2 Cultivo de cepas control en medios comerciales.

Una vez caracterizadas las cepas control se procedió a realizar una estandarización de las condiciones óptimas de cultivo para cada género en cuanto a condiciones de presencia (de oxígeno, pH y temperatura). Las BAL se caracterizan por crecer en un intervalo de pH entre 4-4.5 (Carr *et al.*, 2002). Las temperaturas óptimas para el cultivo de algunos de los géneros de interés son: *Leuconostoc*, 20-30 °C (Leveau, 2000); *Enterococcus*, 37 °C (Díaz *et al.*, 2010), y *Lactobacillus*, 15-45 °C.

Debido a que las BAL son de requerimientos nutricionalmente exigentes (Bjorkröth & Holzapfel, 2006), se evaluó su crecimiento en dos medios diferentes: medio APT (All Purpose with Tween) y MRS (Man Rogosa and Sharpe). Los resultados experimentales demostraron que el medio MRS era el idóneo para el cultivo de este tipo de bacterias ya que es un medio de propósito general para la cuantificación de lactobacilos. Éste medio fue desarrollado por Man J. C., Rogosa M. y Sharpe M. en el año de 1969, en él pueden crecer los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Sin embargo puede hacerse más selectivo mediante un ajuste de pH, ya que los lactobacilos, pediococos y leuconostoc toleran niveles más bajos de pH (Fox *et al.*, 2000).

En cambio el medio APT es un medio de uso general empleado en el crecimiento de BAL que alteran alimentos provocando cambio de color en carne, de rojo a verde por ejemplo, y que requieren un alto nivel de tiamina (Evans & Niven 1951). Cabe resaltar que carece de agentes inhibidores, por lo que permite el desarrollo de casi todos los tipos microbianos.

Es importante señalar que las cepas de BAL, cultivadas en medio MRS formaron colonias de color blanco cremoso, forma redonda, puntiformes, bordes enteros,

superficie convexa, consistencia húmeda y butirosa, las cuales corresponden a características ya reportadas (Fernández y Hernández 1985).

En la [Figura 17](#) se presentan los resultados de crecimiento de las cepas puras obtenidos para el medio APT

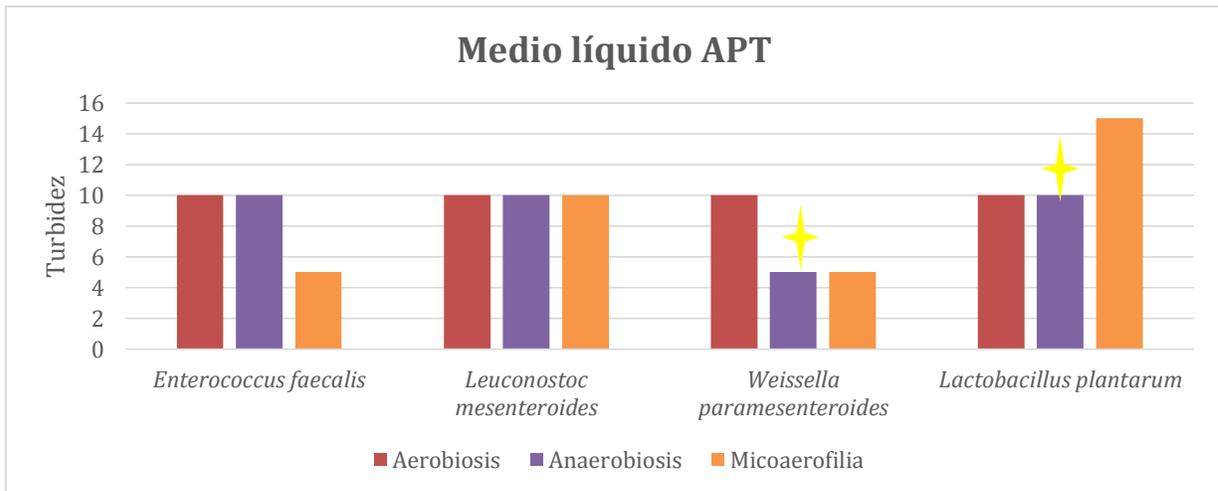


Figura 17. Crecimiento de las 4 cepas control en medio líquido APT, condiciones de aerobiosis, anaerobiosis y microaerofilia. Producción de gas (símbolo amarillo)

Como puede observarse en la [Figura 17](#), el crecimiento resultó abundante para las cuatro cepas control.

Los únicos microorganismos productores de gas en condiciones de anaerobiosis son *W. paramesenteroides* y *Lb. plantarum*. Particularmente *Lb. plantarum*, se caracteriza por ser una bacteria microaerofílica, heterofermentativa, que a partir de 1 mol de glucosa, forma un mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂ (Huertas, 2010). El género *Weissella* pertenece al grupo de los heterofermentativos obligados, al producir ácido láctico, acético y CO₂ como producto del metabolismo de azúcares (Fusco *et al.*, 2015).

Cultivo de cepas control en medio MRS con vancomicina

Como se mencionó en líneas anteriores, el medio MRS evidencia un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias lácticas; sin embargo se busca hacerlo más selectivo mediante la adición de un antibiótico (vancomicina). Esto con el fin de corroborar lo descrito en la literatura, donde se menciona que el género

Leuconostoc y particularmente *L. mesenteroides* presenta una resistencia intrínseca a dicho antibiótico (Fox *et al.*, 2000).

Sin embargo en las últimas décadas se ha observado que un porcentaje importante de cepas del género *Enterococcus* son resistentes a dicho antibiótico; lo que los convierte en importantes agentes de infección nosocomial. Es importante señalar que existen cepas inocuas presentes en el queso Cotija que no están asociadas con el complejo clonal 17 (CC17) vinculado con infecciones nosocomiales, por lo que su presencia no representa un riesgo, en cambio contribuyen en el desarrollo de propiedades sensoriales, y en la producción de sustancias con actividad antimicrobiana (Guzmán, 2015)

En la [Figura 18](#) se muestra el crecimiento de las cepas control en medio MRS con vancomicina

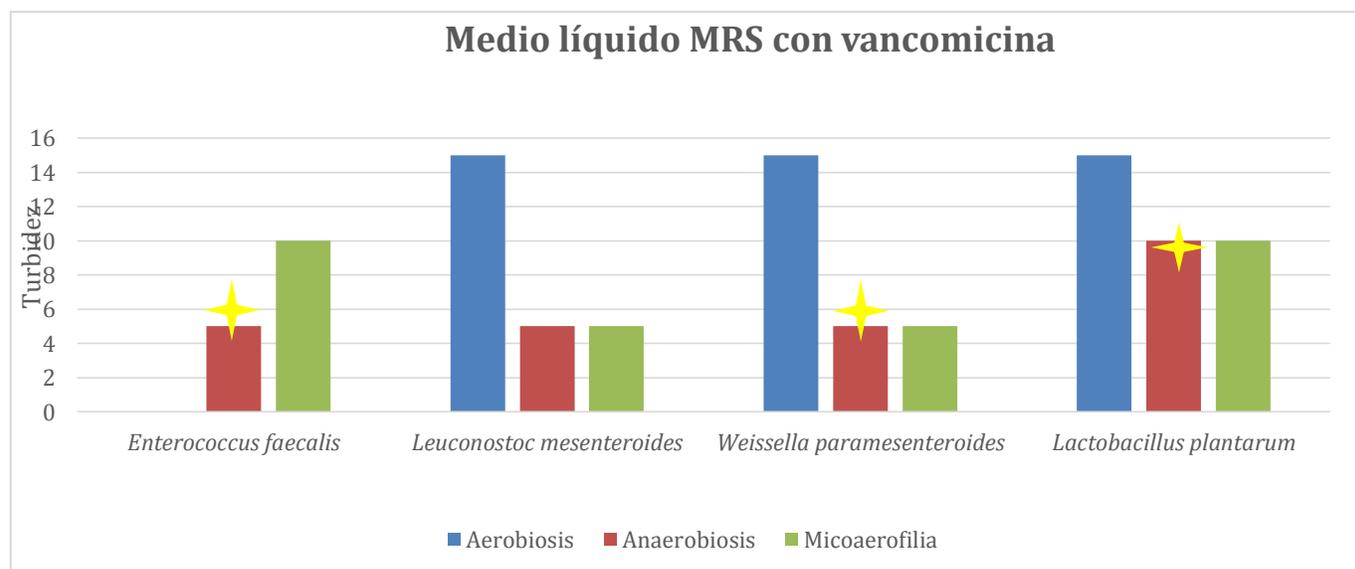


Figura 18. Crecimiento de las 4 cepas control en medio líquido MRS con vancomicina (0.5 mg/mL), condiciones de aerobiosis, anaerobiosis y microaerofilia. Producción de gas (símbolo amarillo)

Se observó que *E. faecalis* no presenta crecimiento en condiciones de aerobiosis, a diferencia de los otros géneros evaluados. Nuevamente en condiciones de anaerobiosis, se observó producción de gas para: *E. faecalis*, *W. paramesenteroides*, *Lb. plantarum*

Cultivo de cepas control en medio MRS pH=4

De acuerdo con trabajos anteriores se sabe que el género *Enterococcus* es muy fácil cultivar a partir de muestras de queso Cotija; por lo que el objetivo principal en esta etapa era inhibir el crecimiento de *E. faecalis*, y favorecer el desarrollo de los otros 3 géneros de interés.

En la [Figura 19](#) se muestran los resultados experimentales para esta condición.

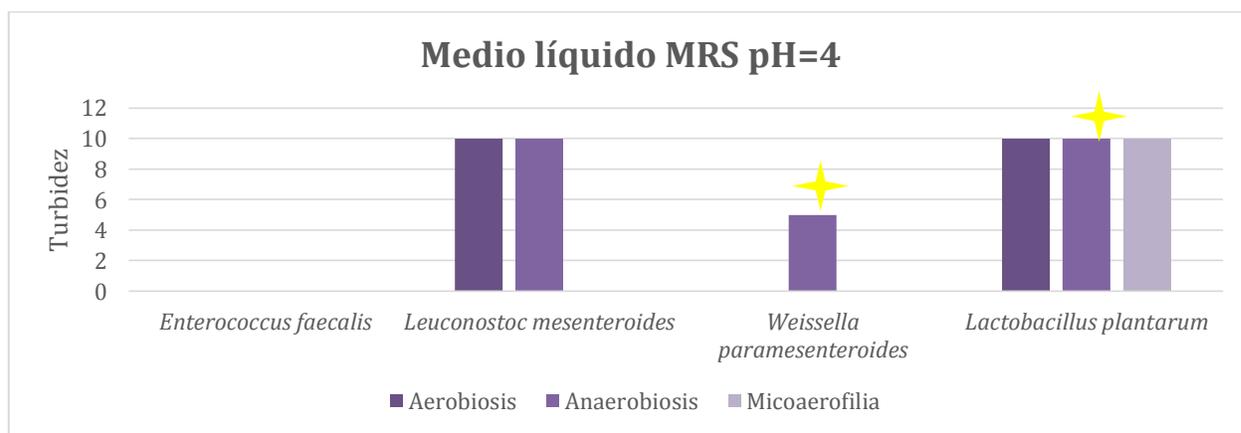


Figura 19. Crecimiento de las 4 cepas control en medio líquido MRS pH=4, condiciones de aerobiosis, anaerobiosis y microaerofilia. Producción de gas (símbolo amarillo)

El medio líquido MRS pH= 4 resultó adecuado para el cultivo de los tres géneros de interés (*Leuconostoc*, *Weissella*, y *Lactobacillus*), ya que en dicho medio se inhibe el crecimiento de *E. faecalis* en las tres condiciones evaluadas (aerobiosis, anaerobiosis y microaerofilia). Es importante señalar que se ve favorecido el crecimiento de las especies *Lb. plantarum* y *L. mesenteroides* en condiciones de aerobiosis.

De acuerdo con la literatura *Lb. plantarum* es considerada una de las especies más ácido tolerantes, capaz de terminar la fermentación en vegetales (Ams, 2004), debido a ello le fue posible crecer bajo estas condiciones. De acuerdo con la literatura, la especie *Leuconostoc mesenteroides* presenta un crecimiento óptimo a un pH de 5.2 (García *et al.*, 2004), sin embargo observamos que no mostró dificultad para crecer en un medio con un pH inferior.

Puesto que los resultados experimentales demostraron que este medio es apropiado para el desarrollo de los géneros con mayor abundancia relativa en el queso, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio líquido MRS pH 4 a 29°C durante 24 h, y se registró el valor de la densidad óptica (600 nm) cada 2 h (Figura 20).

Así mismo podemos observar que la especie *Enterococcus faecalis* no crece bajo estas condiciones; esto permitirá recuperar a dos de las especies con mayor abundancia en el queso Cotija.

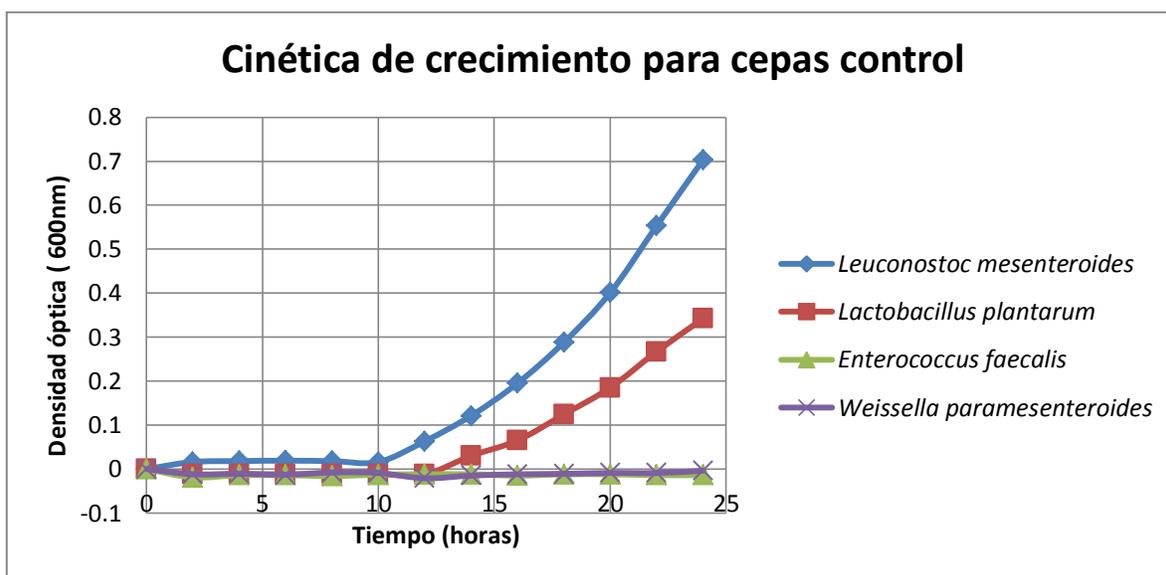


Figura 20. Cinéticas de crecimiento para las cepas control en medio líquido MRS pH=4 a 29 °C, condiciones de aerobiosis durante 24 h.

Como puede observarse en la Figura 20, tras aproximadamente 10 h de incubación ninguna cepa presenta una DO superior a 0.1, ya que todas ellas se encuentran en fase de adaptación al medio; transcurrido este tiempo (>10 h) las únicas cepas que presentan crecimiento son *L. mesenteroides* y *Lb. plantarum*, encontrándose en fase logarítmica. Particularmente el crecimiento de *L. mesenteroides* se ve favorecido a un pH de 4, ya que presenta un mayor valor de DO (0.7) con respecto a *Lb. plantarum* con un valor de DO de 0.3.

7.3 Cultivo de cepas control en medio de Queso Cotija

Se decidió elaborar también un medio a partir de un extracto acuoso de queso Cotija, debido a que éste pudiera contener nutrientes que favorecieran el cultivo de las BAL de interés. En el medio de Queso Cotija sólido, se inocularon a las cepas control. El crecimiento de estas cepas fue lento, puesto que se observó presencia de colonias (color blanco, puntiformes, de borde plano, opacas y de consistencia suave) hasta después de los 10 días de incubación a una temperatura de 29 °C y en condiciones de aerobiosis. Cabe resaltar que las colonias que crecieron en este medio presentaron características muy similares entre ellas, como en color, textura, borde y consistencia. El crecimiento lento de las cepas evaluadas podría explicarse, ya que éstas no fueron aisladas del queso Cotija, sino de algún otro alimento fermentado (pulque o atole agrio).

Cabe resaltar que el medio desarrollado es un medio pobre en fuente de carbono que además puede llegar a carecer de algunos factores de crecimiento tales como vitaminas liposolubles e hidrosolubles que se encuentren en cantidades muy bajas lo que limitaría el crecimiento y desarrollo de las BAL.

7.4 Aislamiento de colonias a partir de un “pool” de quesos Cotija

De acuerdo con los resultados anteriores las condiciones óptimas de cultivo que podrían favorecer el desarrollo de los géneros de BAL de interés a partir del queso, son: medio MRS pH 4 y medio de extracto acuoso de queso Cotija pH 4 en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

En el laboratorio contamos con aproximadamente 80 muestras de queso artesanal madurado producido en la Región de Origen. Se seleccionaron un total de 19 muestras (4 g de cada queso previamente homogeneizado y almacenado a 4 °C) tomando en cuenta los criterios descritos en la sección 5.4 de la Metodología.

Un total de 65 cepas de bacterias y 6 levaduras se aislaron del “pool” de queso Cotija. A estas cepas se les realizaron pruebas de identificación preliminar mediante morfología micro y macroscópica, así como prueba de catalasa.

Las colonias aisladas en placas de agar MRS y en el medio desarrollado (extracto acuoso de queso Cotija adicionado con agar al 1%) eran de color blanco, y beige, puntiformes, de superficie convexa, con bordes definidos, de apariencia cremosa, consistencia húmeda, suave y viscosa.

Para verificar la pureza de las cepas se realizó tinción de Gram ([Anexo 1](#)). Al observarse al microscopio se encontraron entre los diversos aislamientos, bacilos, cocos y levaduras. De los cuales, los primeros mencionados se encontraban agrupados en cadenas, mientras que los segundos en racimos y cadenas. Las colonias identificadas como levaduriformes fueron crioconservadas con glicerol a -70°C y se descartan en la siguiente parte del análisis.

Todas las cepas evaluadas dieron negativo para la prueba de catalasa, esto significa que no existe producción de gas (O₂) y liberación de agua al adicionar peróxido de hidrogeno al 3%. ([Tabla 6](#)).

Mediante la observación macro y microscópica se diferenciaron al menos 3 grupos de BAL, dentro de los cuales podrían haber más de un género y especie.

En la [Tabla 6](#) se muestra la relación de colonias aisladas:

Tabla 6. Relación de colonias aisladas del pool de queso Cotija

Condición	Número de colonias aisladas	Gram	Catalasa	Morfología microscópica	Descripción macroscópica
MRS pH 4 con Agitación	3	(+)	(-)	Bacilos cortos en cadenas	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave.
MRS pH 4 Estático	3	(+)	(-)	Bacilos largos en cadenas	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave.
	2	(+)	(-)	Cocos en racimos	Colonia de color blanco, de forma redondeada,

					borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa.
Extracto acuoso de queso Cotija pH 4 Agitación	3	NA	NA	Levaduras	Colonia de color blanco, de elevación circular, con aspecto brillante y húmedo. De consistencia suave.
Extracto acuoso de queso Cotija pH 4 Estático	3	NA	NA	Levaduras	Colonia de color blanco, de elevación circular, con aspecto brillante y húmedo. De consistencia suave.
Aislamientos con benzoato de sodio (0.1 g/mL)					
MRS pH 4 con Agitación	5	(+)	(-)	Bacilos cortos en cadenas	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave
	3	(+)	(-)	Bacilos muy cortos en cadenas	Colonia de color blanco, de forma ondulada, borde convexo y elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave.
	11	(+)	(-)	Cocos en racimos y cadenas	Colonia de color beige, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa.
MRS pH 4 Estático	5	(+)	(-)	Bacilos cortos en cadenas	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave.
	8	(+)	(-)	Bacilos largos y delgados en cadenas	Colonia de color beige, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave.
	1	(+)	(-)	Cocos en racimos y cadenas	Colonia de color beige, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa
	8	(+)	(-)	Cocos en racimos	Colonia de color beige, de

					forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa
Extracto acuoso de queso Cotija pH 4 Agitación	4	(+)	(-)	Bacilos cortos en cadenas	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa
	2	(+)	(-)	Cocos en racimos	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa.
Extracto acuoso de queso Cotija pH 4 Estático	3	(+)	(-)	Cocos muy pequeños en racimos	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa.
	4	(+)	(-)	Bacilos cortos en cadenas	Colonia de color beige, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave.
Extracto acuoso de queso Cotija Agitación	2	(+)	(-)	Bacilos esporulados en cadenas	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave
	1	(+)	(-)	Cocos en racimos	Colonia de color beige, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa.

***NA: No aplica**

De acuerdo con los resultados experimentales se recuperaron en mayor proporción bacilos cortos y largos agrupados en cadenas, seguido de cocos asociados en racimos y cadenas, y en menor proporción levaduras.

Particularmente las levaduras contribuyen a la producción de compuestos de sabor a partir de sus capacidades proteolíticas, peptídicas, lipolíticas y esterásicas. También metabolizan el ácido láctico, formado por la fermentación de las bacterias lácticas, crecen a altas concentraciones de sal y desde los primeros días de la maduración, promoviendo la desacidificación que ayudará a que otras bacterias no lácticas crezcan (*Micrococci* y *Coryneformes*) formando parte también de esta microbiota secundaria (Beresford *et al.*, 2001; Lopandic *et al.*, 2006). Las levaduras pueden provenir de la materia prima, la leche con la que se elabora el queso y también de la manipulación por parte del productor.

Con base en los resultados de las cepas control, comprobamos que la especie *Enterococcus faecalis* no presenta crecimiento en medio MRS pH 4. Por lo que los aislados cuya morfología corresponda a cocos Gram (+) agrupados en pares, cadenas o racimos, podrían pertenecer a los géneros de *Weissella* y *Leuconostoc*; géneros reportados como dominantes en el metagenoma del queso Cotija (Escobar, 2016).

En cambio los aislados que poseen una morfología que corresponde a bacilos Gram (+) agrupados en cadenas podrían pertenecer al género *Lactobacillus*. Sin embargo para poder sustentar dicho enunciado se realizará la identificación molecular de dichas cepas mediante la amplificación del gen ribosomal 16 S, siguiendo lo descrito en la sección 5.6 de la Metodología.

Imágenes de las morfologías microscópicas encontradas en las colonias aisladas del queso Cotija se muestran de la [Figura 21](#) a la [29](#).

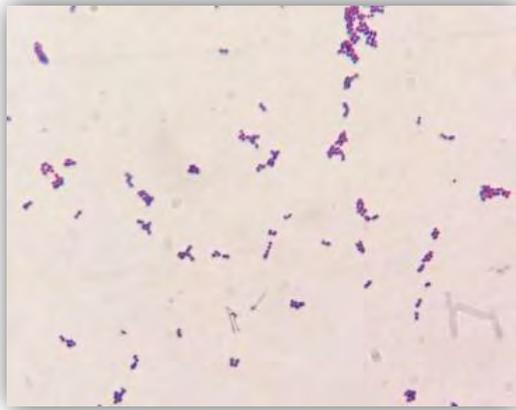


Figura 21. Cocos Gram (+) agrupados en pares y racimos aislados de la condición 1. Figura 22. Bacilos Gram (+) agrupados en cadenas aislados de la condición 1

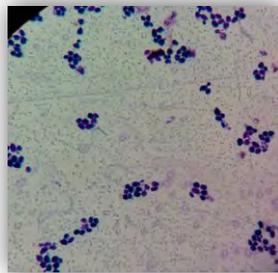


Figura 23. Levaduras teñidas con cristal violeta aislados de la condición 5

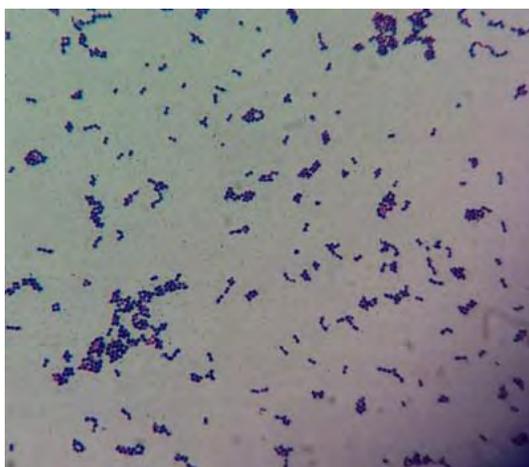


Figura 24. Cocos Gram (+), agrupados en racimos y cadenas aislados de la condición 1

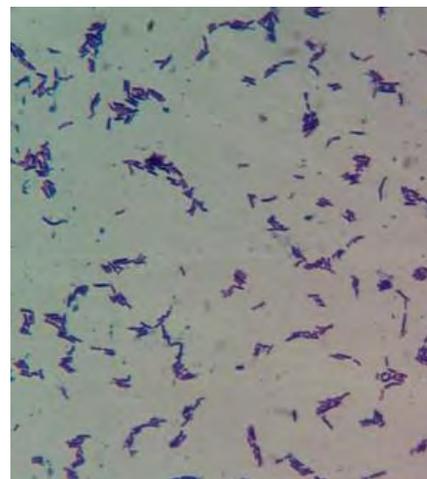


Figura 25. Bacilos Gram (+) aislados de la condición 5.

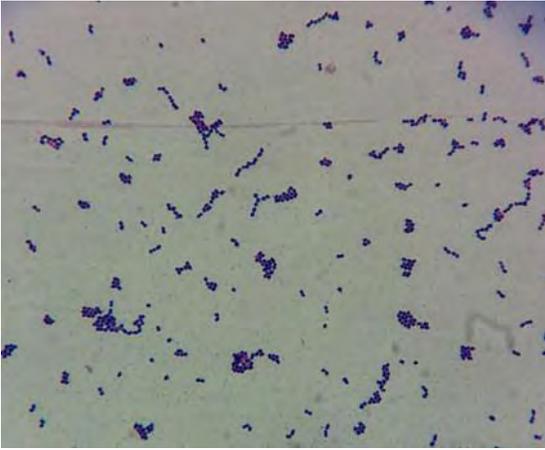


Figura 26. Cocos Gram (+), agrupados en parejas y cadenas aislados de la condición 1

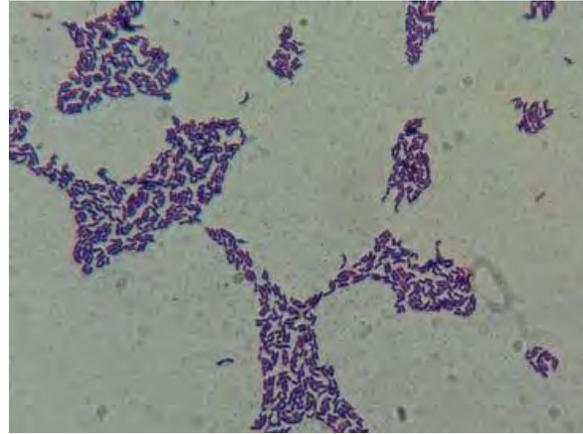


Figura 27. Bacilos Gram (+) aislados de la condición 2

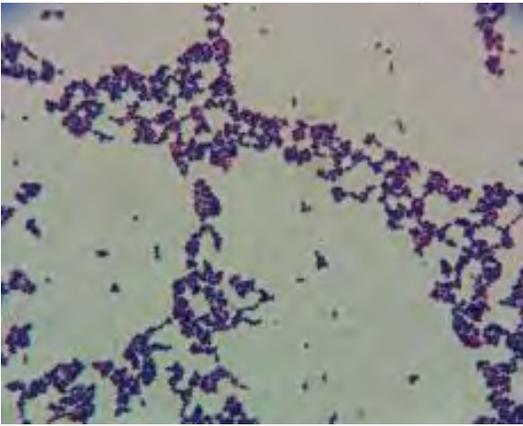


Figura 28. Cocos Gram (+), agrupados en racimos, condición 1

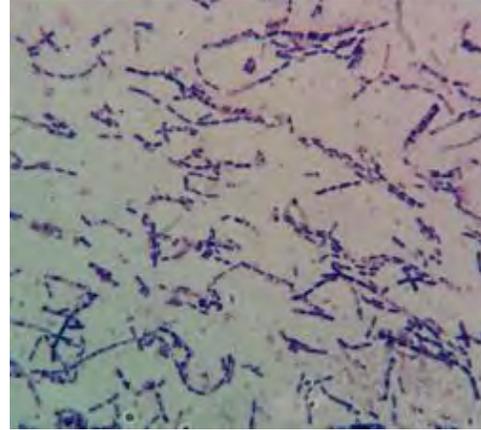


Figura 29. Bacilos Gram (+), esporulados agrupados en cadenas, condición 8

En 2008 Bravo intentó aislar bacterias ácido lácticas, utilizando los siguientes medios: MRS, Agar LM17 y KAA (Kanamycin Aesculin Azide), evaluó diferentes condiciones de cultivo (pH 5 y 7, temperaturas de 37 °C, 22°C y 42°C y condiciones de aerobiosis, anaerobiosis y microaerofilia); sin embargo ella sólo utilizó dos piezas de queso Cotija consideradas Región de Origen.

De acuerdo con sus resultados, encontró que las morfologías predominantes eran cocos y bacilos; como las encontradas en éste trabajo y que se describen en la [Tabla 6](#), donde todos son cocos Gram (+) recuperados en las diferentes condiciones evaluadas; así como bacilos cortos, largos y algunos con esporas, también Gram (+), no reportados con anterioridad.

Cabe resaltar que, para el presente trabajo se desarrolló un medio a partir de un extracto de queso Cotija, el cual pudiese contener factores que permitan el desarrollo de esta microbiota característica, que no ha sido aislada con anterioridad en medios comerciales.

La selección de cepas a tipificar se realizó tomando como primer criterio la morfología microscópica seguido de la macroscópica. Las cepas de BAL en general forman colonias de color blanco cremoso, forma redonda, puntiformes, bordes enteros, superficie convexa, consistencia húmeda y butirosa por lo que este criterio es bastante robusto.

No obstante las colonias aisladas presentan los siguientes criterios; colores: blanco y beige, forma redondeada u ondulada, borde plano y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave o viscosa, es decir que incluso en las características de morfología colonial hay cierta diversidad que nos permite usarlo como criterio de decisión.

Las colonias seleccionadas para su identificación mediante la amplificación del gen ribosomal 16 S se enumeran en la [Tabla 7](#).

Tabla 7. Relación de colonias seleccionadas para su identificación mediante la amplificación del gen ribosomal 16 S.

Condición	Morfología microscópica	Morfología macroscópica	Código
MRS pH 4 Agitación (adición de benzoato de sodio)	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave	M
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos.	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave	T1
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos.	Colonia de color blanco, de forma	T2

	redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave	
Cocos Gram + agrupados en pares y racimos.	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave	T3
Cocos Gram + agrupados en pares y racimos.	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave	A
Cocos Gram + agrupados en pares y racimos.	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave	T4
Cocos Gram + agrupados en pares y racimos.	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave	T5
Cocos Gram + agrupados en pares y racimos.	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave	T6
Cocos Gram + agrupados en pares y racimos.	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave	B
Cocos Gram + agrupados en pares y racimos.	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De	C

		aspecto brillante y consistencia suave	
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos.	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave	D
	Bacilos Gram +, agrupados en cadenas.	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave	X
MRS pH 4 Estático (adición de benzoato de sodio)	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color beige, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa.	E
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color beige, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa.	F
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave	G
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color beige, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa.	H
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave	I
	Cocos Gram + agrupados en	Colonia de color	J

	pares y racimos	beige, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa.
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave K
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color beige, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa. L
MRS pH 4 Agitación (sin adición de benzoato de sodio)	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave M
	Bacilos Gram +, agrupados en cadenas	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave. O
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa. P
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave R
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de S

		elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave T
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa.
MRS pH 4 Estático (sin adición de benzoato de sodio)	Bacilos Gram +, agrupados en cadenas y/o pares.	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave. Q
	Bacilos Gram +, agrupados en cadenas y/o pares.	Colonia de color blanco, de forma redondeada, borde plano convexa y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia suave. V
	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color beige, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa. W
Extracto acuoso de queso Cotija pH 4 Agitación (adición de benzoato de sodio)	Cocos Gram + agrupados en pares y racimos	Colonia de color beige, de forma redondeada, borde entero, y de elevación circular. De aspecto brillante y consistencia viscosa. N

7.5 Análisis de ADN extraído

De las colonias seleccionadas se realizó la extracción de ADN y en geles de agarosa al 1% se observaron bandas intensas definidas de alto peso molecular y sin barrido; lo que significa que el ADN se encuentra íntegro y en óptimas condiciones para llevar a cabo la reacción de amplificación.

Los valores de la relación A260/A280 nm y la concentración de las extracciones de ADN se encuentran en el [Anexo 4](#).

De acuerdo con los resultados experimentales las extracciones de ADN fueron aceptables (relación A260/A280 mayor a 1.8 y concentración mayor a 15 ng/ μ L).

7.6 Análisis de amplicones

Para todos los productos de amplificación del gen ribosomal 16S, se observó que el producto tuviese el peso molecular esperado (1500 bp aproximadamente) en geles de agarosa al 1%. Sin embargo para las muestras con los códigos que van de la letra A a la G se observa la presencia de bandas poco intensas de alto peso molecular (aproximadamente 3000 pb).

La presencia de estas bandas puede deberse a un producto inespecífico en la amplificación o bien al tipo de primers utilizados en la amplificación del gen ribosomal 16S. Debido a que los primers fD1 y rD1 son capaces de amplificar una amplia variedad de taxa bacterianos, entre los cuales se encuentran bacterias Gram positivas de los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Streptococcus* (Weisburg *et al.*, 1991) por mencionar algunas.

Cabe resaltar que dichos primers se utilizaron en experimentos anteriores, mostrando un producto de amplificación adecuado; razón por la cual se decidió utilizarlos.

En las [Figuras 30](#) y [31](#) se muestra el producto de amplificación para algunas de las colonias aisladas.

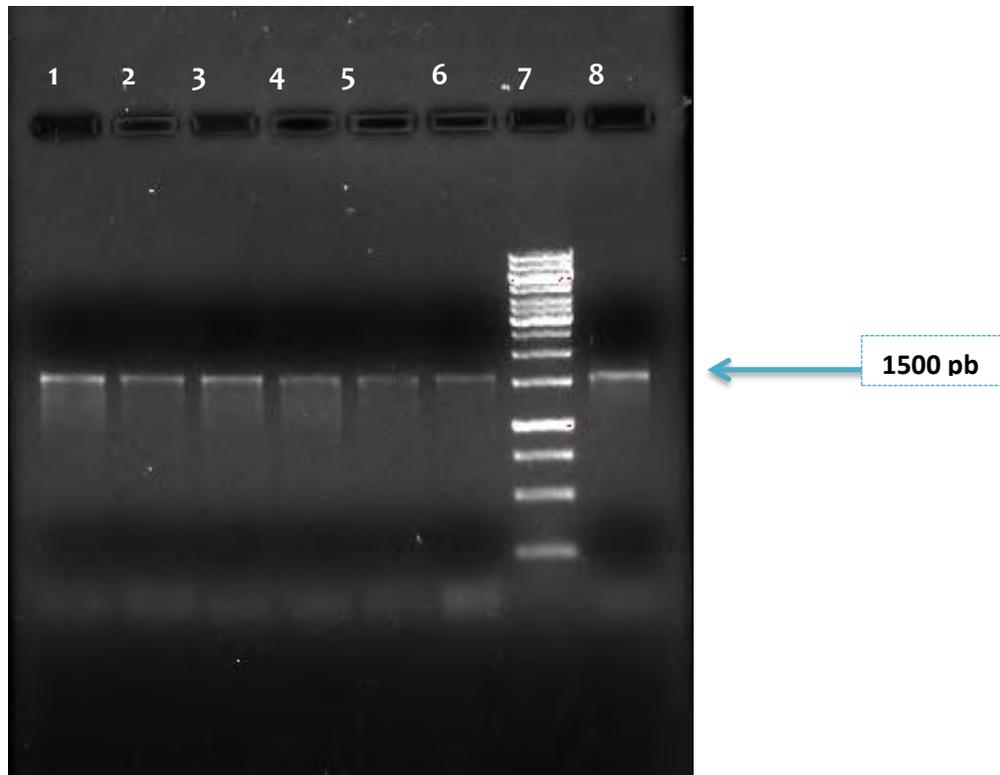


Figura 30. Gel de agarosa al 1%, productos de la reacción de amplificación. Carril 1 (T1), Carril 2 (T2), Carril 3 (T3), Carril 4 (T4), Carril 5 (T5), Carril 6 (T6), Carril 7 (marcador GeneRuler1Kb DNA Ladder), Carril 8 (M).

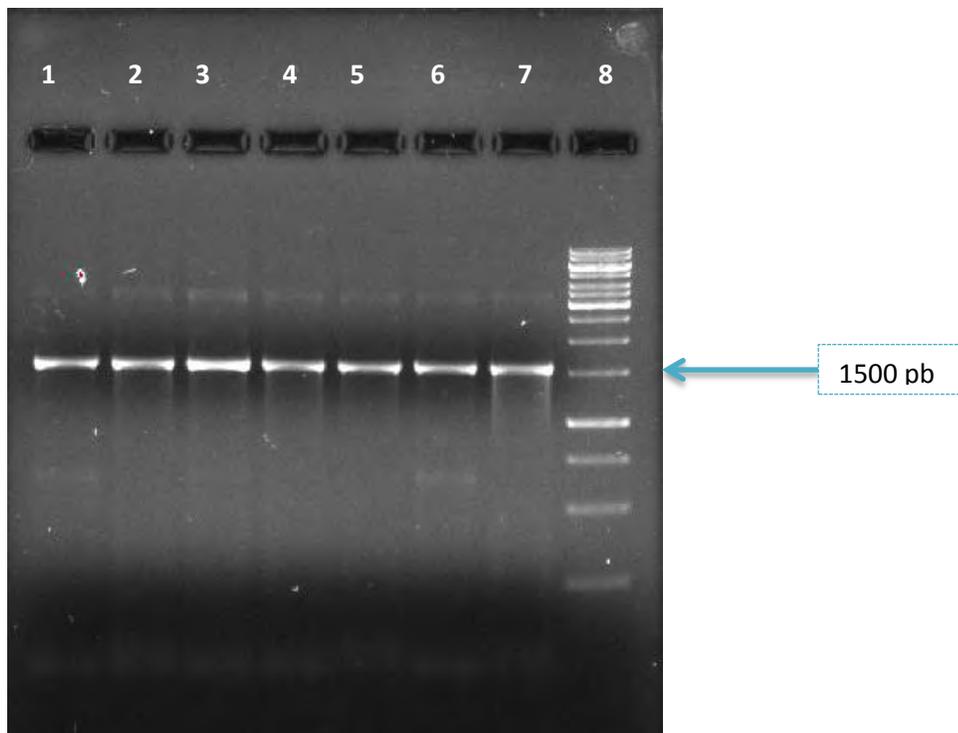


Figura 31. Gel de agarosa al 1%, productos de la reacción de amplificación, Carril 1 (A), carril 2 (B). Carril 3 (C), Carril 4 (D), Carril 5 (E), Carril 6 (F), Carril 7 (G), Carril 8 (marcador GeneRuler1Kb DNA Ladder).

Se realizó la purificación de banda para aquellas cepas donde se observó inespecificaciones durante el proceso de amplificación, y estas fueron secuenciadas.

Del resultado de la secuenciación se obtuvieron las secuencias nucleotídicas hasta 1400 nucleótidos para la mayoría de las cepas.

7.7 Identificación de bacterias

En la [Tabla 8](#) se muestran los resultados del análisis BLASTn (16S ribosomal RNA Sequences (Bacteria and Archaea) de la región a amplificar del gen ribosomal 16S usando los cebadores fD1 y rD1 (Directo e Inverso).

Tabla 8. Tabla de identidad de las cepas muestra comparadas con la base de datos del NCBI (16S ribosomal RNA Sequences (Bacteria and Archaea)).

Muestra	Código	Microorganismo	Cobertura (%)	Valor E	Identidad (%)	Número de la referencia más similar.
T1	Condición 1, colonia 2 Agitación	<i>Enterococcus faecium strain ATCC 700221</i>	99	0.0	99	CP014449.1
T2	Condición 1, colonia 3 Agitación	<i>Enterococcus faecium strain HN-N26</i>	99	0.0	99	FJ378681.1
T3	Condición 1, colonia 4 Agitación	<i>Enterococcus faecium strain DSM 20477 16S</i> <i>Enterococcus faecium strain HN-N26</i>	99	0.0	98	114742.1 FJ378681.1
T4	Condición 1, colonia 2 Agitación	<i>Enterococcus faecium strain ATCC 700221</i>	99	0.0	99	CP014449.1
T5	Condición 1, colonia 3 Agitación	<i>Enterococcus faecium strain ATCC 700221</i>	99	0.0	99	CP014449.1
T6	Condición 1, colonia 3 Agitación	<i>Enterococcus faecium strain ATCC 700221</i>	99	0.0	99	CP014449.1
A (forward)	Condición 1, colonia	<i>Enterococcus faecium</i>	98	0.0	96	113904.1 (f)

	5 Agitación					
B	Condición 1, colonia 4 Agitación	<i>Enterococcus faecium strain ATCC 700221</i>	99	0.0	99	CP014449.1
C (reverse)	Condición 1, colonia 5 Agitación	<i>Enterococcus faecium</i>	99	0.0	99	102790.1
D	Condición 1, colonia 6 Agitación	<i>Enterococcus faecium strain ATCC 700221</i>	99	0.0	99	CP014449.1
E	Condición 2, colonia 1 Estático	<i>Enterococcus faecium strain ATCC 700221</i>	99	0.0	99	CP014449.1
F	Condición 2, colonia 2 Estático	<i>Enterococcus faecium isolate EFE10021</i>	99	0.0	99	LN999844.1
G	Condición 2, colonia 3 Estático	<i>Enterococcus faecium strain ATCC 700221</i>	99	0.0	99	CP014449.1
H	Condición 2, colonia 4 Estático	<i>Enterococcus faecium strain ATCC 700221</i>	99	0.0	99	CP014449.1
I	Condición 2, colonia 5 Estático	<i>Enterococcus faecium strain ATCC 700221</i>	99	0.0	99	CP014449.1
J	Condición 2, colonia 6 Estático	<i>Enterococcus faecium strain ATCC 700221</i>	99	0.0	99	CP014449.1
K	Condición 2, colonia 7 Estático	<i>Enterococcus faecium strain ATCC 700221</i>	99	0.0	99	CP014449.1
L	Condición 2, colonia 8 Estático	<i>Enterococcus faecium strain ATCC 700221</i>	99	0.0	99	CP014449.1
M	Condición 1, colonia 1 Agitación	<i>Enterococcus faecium isolate EFE10021</i>	99	0.0	99	LN999844.1
N (MQC)	Condición 5, colonia 3. Agitación	<i>Weissella confusa JCM 1093</i>	74 (r)	0.0	97 (r)	113258.1
O (forward)	Condición 1. Colonia 1 Agitación s/b	<i>Lactobacillus brevis ATCC 367</i>	54	0.0	92	074024.1
P (MRS)	Condición 5, colonia 1.	<i>Weissella confusa strain: NH 02</i>	97	0.0	99	AB425970.1 113258

	Agitación s/b	<i>Weissella confusa strain JCM 1093 16S</i>				
Q	Condición 2, colonia 1	<i>Lactobacillus casei gene for strain: JCM 2120</i>	97	0.0	99	AB690248.1
S	Condición 1, colonia 4	<i>Enterococcus sp. LMG 1752</i>	65	0.0	99	KT366869.1
T	Condición 1, colonia 7	<i>Enterococcus faecium strain ATCC 700221</i>	99	0.0	99	CP014449.1
V	Condición 2, colonia 2	<i>Lactobacillus paracasei strain KL1</i>	99	0.0	99	CP013921.1
W	Condición 2, colonia 7	<i>Pediococcus pentosaceus SL4</i>	99	0.0	77	CP006854.1
X	Condición 2, colonia 4 MRS c/b	<i>Lactobacillus brevis KB290</i>	99	0.0	98	AP012167.1

*MQC: Medio de queso Cotija *MRS: Medio Man Rogosa and Sharpe *Forward: Secuencia del cebador directo *Reverse: Secuencia del cebador inverso.

De acuerdo con los resultados arrojados por el alineamiento, usando el algoritmo BLAST podemos observar que tenemos valores altos de identidad para la mayoría de las cepas aisladas, sin embargo las cepas con las siguientes letras: A, N, O y W, presentan un porcentaje de identidad bajo (menor al 99%); debido a ello el alineamiento puede considerarse no significativo

Es importante tomar en cuenta que la cantidad de resultados por comparación de secuencias depende de la base de datos disponible, lo que dificulta la identificación de estas. Puesto que las secuencias en estudio, presentan baja semejanza, se propone como estrategia alterna realizar una segunda secuenciación, con el fin de confirmar la presencia de las mismas en la base de datos; no obstante es viable pensar que podríamos tener secuencias no descritas.

En general podemos observar que el género *Enterococcus*, vuelve a estar presente en la mayoría de las muestras aisladas e identificadas, donde sobresale la especie *E. faecium*. Seguido del género *Lactobacillus* con las especies *Lb. brevis*, *Lb. casei*,

y *Lb. paracasei*; en menor proporción tenemos al género *Weissella* con la especie *W. confusa* y *Pediococcus* con la especie *P. pentosaceus*.

BLAST es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, que compara la secuencia problema contra diferentes secuencias depositadas en la base de datos del GenBank; dando como resultado una amplia lista de microorganismos similares a esa secuencia. Sin embargo debemos resaltar que sigue un algoritmo de tipo heurístico que hace alineamientos locales, por lo que las similitudes encontradas no necesariamente son las correctas. Por ello fue necesario complementar y sustentar la identificación por BLAST mediante la elaboración de un análisis filogenético.

El modelo matemático empleado en este tipo de análisis arroja como resultado un árbol filogenético que permite establecer relaciones de parentesco (topología del árbol) y medir la cantidad del cambio acumulado (longitud de la rama). El modelo matemático utilizado para este análisis se basa en la comparación de la secuencia completa, por lo que los resultados que arroja son más confiables que el BLAST. Para su elaboración, se seleccionaron secuencias de referencia reportadas en la base de datos del NCBI para cada género (*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* y *Leuconostoc*) seguido de una secuencia de un grupo externo al grupo de interés (en este caso se seleccionó a *E. coli*) y las secuencias problema. Enseguida se realizó un alineamiento múltiple, y se efectuó un re-muestreo (1000 réplicas) con el fin de obtener un árbol consenso (Figura 32).

Como puede observarse, las secuencias analizadas se encuentran asociadas a los grupos de referencia, lo que confirma los resultados de identidad obtenidos por BLAST.

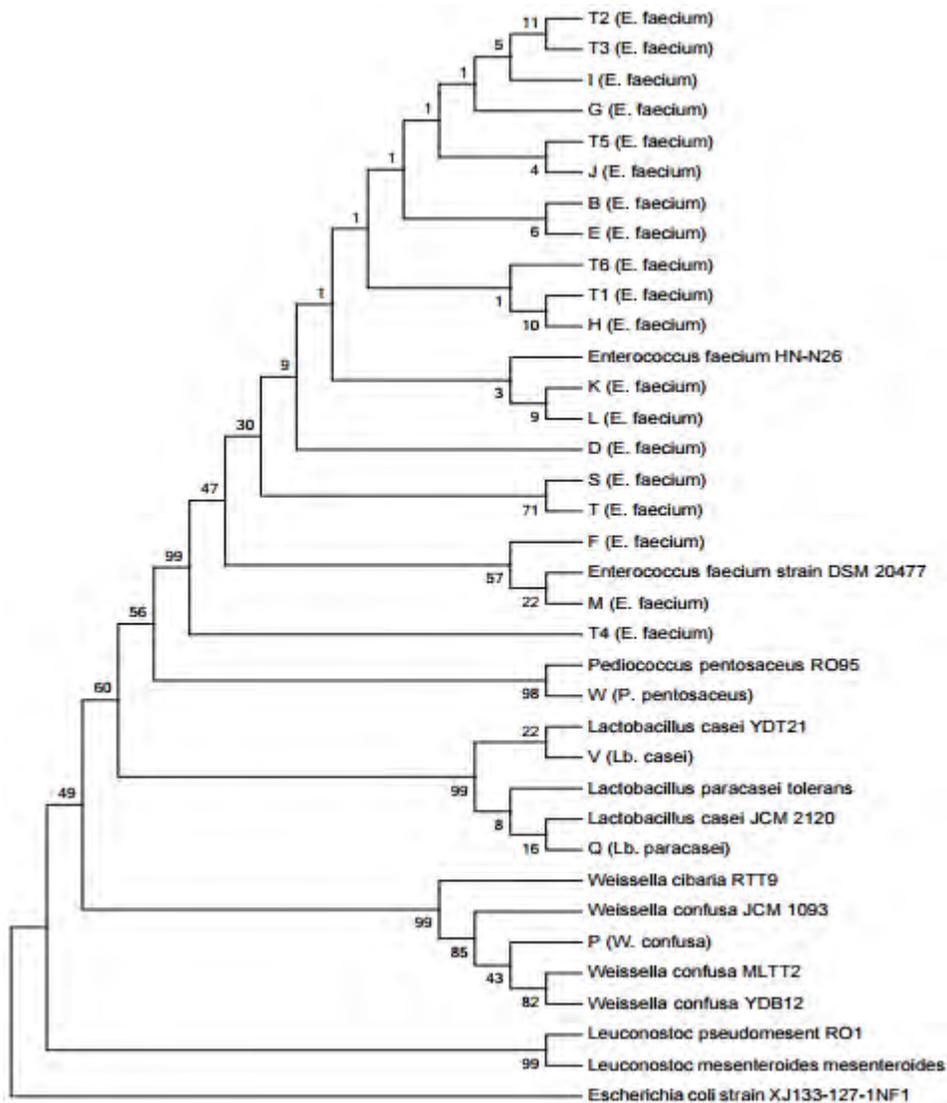


Figura 32. Relación filogenética de las cepas agrupadas como *Lactobacillales*. Árbol consenso (Referencia detallada en el punto 6.7, página 45). Se utilizó *E. coli* como referencia externa para representar una secuencia diferente a los géneros *Enterococcus*, *Weissella*, y *Pediococcus*

7.8 Características y filogenia de los microorganismos identificados

Para facilitar el estudio de las cepas identificadas, estas se agruparon de acuerdo al orden (*Lactobacillales*) en el que se encuentran. Particularmente a éste pertenecen bacterias Gram-positivas, dentro de la división *Firmicutes*. Entre los géneros representativos tenemos a: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*.

Lactobacillales

ORGANISMO *Enterococcus faecium*

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Enterococcaceae; Enterococcus

Enterococcus

Microorganismo	Cepa	Total
Enterococcus faecium	T1, T2, T3, T4, T5, T6, B, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, S, T	19

El género *Enterococcus* se encuentra dentro de la familia *Enterococcaceae* y pertenece al grupo de bacterias ácido lácticas (BAL). Son cocos Gram (+), no esporulados, oxidasa, catalasa y reductasa negativos, anaerobios facultativos, se pueden encontrar solos, en pares o en cadenas cortas (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Su metabolismo es homofermentativo, siguen la vía de Embden-Meyerhof-Parnas, produciendo ácido láctico a partir de la fermentación de hexosas (Garg y Mital, 1991). Este género en particular tiene la capacidad de crecer en un amplio intervalo de temperatura que va de los 10° a 45 °C. De la misma manera puede crecer en un rango de pH que va de 4 a 9.6, con 6.5% de NaCl, en presencia de azida de sodio y tienen la capacidad de hidrolizar la esculina en presencia de 40% de bilis (Giraffa, 2003; Franz *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Es un microorganismo que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, se le puede encontrar en el tracto gastrointestinal y heces de mamíferos, y debido a su habilidad de sobrevivir a ambientes adversos, los enterococos pueden colonizar diversos nichos y se suelen encontrar en el agua, en el suelo, en las plantas y vegetales, así como en alimentos de origen animal y alimentos fermentados (Giraffa, 2003).

Los enterococos pueden ser añadidos de manera accidental o intencional (cultivo iniciador) en la preparación de alimentos fermentados (especialmente embutidos y quesos madurados), ya que contribuyen a la maduración y desarrollo de

características organolépticas deseables, tales como el aroma y sabor, debido a la producción de ácido láctico y de metabolitos obtenidos de la actividad proteolítica y lipolítica. Particularmente la especie *Enterococcus faecium* es capaz de fermentar el citrato, el cual es metabolizado en piruvato y finalmente deriva en la producción de compuestos de aroma tales como diacetilo, acetoina y 2,3-butanodiol (Martino, *et al.*, 2015).

De acuerdo con la literatura se ha descrito la presencia de *Enterococcus* en varios quesos europeos tales: Feta (Grecia) (Sarantinopoulos, P. *et al.*, 2002a; Litopoulou-Tzanetaki, E. *et al.*, 1993), Cheddar (Jensen, J. *et al.*, 1975a; Jensen, J. *et al.*, 1975b), Mozzarella di buffala campana (Italia) (Coppola S, *et al.*, 1998; Villani, F. and Coppola, S., 1994), Cebreiro (Centeno JA. *et al.*, 1999; Centeno JA. *et al.*, 1996) (España); Picante de Beira Baixa (Portugal) (Freitas AC. *et al.*, 1995), Tetilla (España) (Menendez, S. *et al.*, 2001) y Pecorino Sardo (Italia) (Mannu, L. and Paba, A. 2002). Asimismo se caracterizan por producir una variedad de bacteriocinas llamadas enterocinas, las cuales tienen como blanco de acción principal la membrana citoplasmática. Las enterocinas reportadas tienen actividad contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y *Vibrio cholerae* (Maisnier-Patin *et al.*, 1996; Nunez *et al.*, 1997; Ennahar *et al.*, 1998; Laukova y Czikkova, 2001; Sarantinopoulos *et al.* 2002).

Lactobacillus

Microorganismo	Cepa	Total
<i>Lactobacillus brevis</i>	X, O	2
<i>Lactobacillus casei</i>	Q	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	V	1

ORGANISMO *Lactobacillus brevis*

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus

El género *Lactobacillus* (lactis-leche; bacillus-pequeños bacilos) se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o cocobacilos coryneformes (Kandler y Weiss

1986). Regularmente se presentan formando cadenas; son Gram positivos, catalasa negativos, no producen indol, ni ácido sulfhídrico (H₂S). Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica, sin embargo se ha visto que algunas cepas presentan una ligera actividad debido a proteasas y peptidasas ligadas a la pared celular o liberadas al medio, así como una débil actividad lipolítica debido a la acción de lipasas intracelulares (Law y Kolstad, 1983). Los lactobacilos contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados debido a la producción de compuestos volátiles tales como diacetilo y sus derivados en el queso (Law y Kolstad, 1983). Crecen bien en medios ligeramente ácidos con un pH inicial de 6.4-4.5 y con un óptimo de desarrollo entre 5.5 y 6.2. Los lactobacilos son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4.0 mediante la producción de ácido láctico. De esta forma evitan y disminuyen el crecimiento de otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias ácido lácticas y el de levaduras (Holt *et al.*, 1994).

La mayoría de cepas de *Lactobacillus* son aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas. En general son mesófilos (30°- 40 °C) con un límite superior de 40°C.

La especie *Lb. brevis* es una bacteria ácido láctica, Gram positiva, heterofermentativa obligada y microaerofílica que ha sido aislada de una gran variedad de entornos diferentes tales como: sauerkraut (Beganovic, J. *et al.*, 2014), masa madre de trigo (Zaib-Un-Nisa, *et al.*, 2016), ensilados (Checolli, M. *et al.*, 2015), y el tracto intestinal de animales y humanos (Uroic *et al.*, 2014). Sin embargo se ha reportado que posee un papel muy importante como cultivo iniciador en diferentes alimentos fermentados entre algunos tenemos, quesos ahumados frescos originarios de Croacia, masas dulces utilizadas en la producción de panes como Panettone, Colomba y panes Pandoro (Lähteinen T, *et al.*, 2014) (Vogel & Nyanga, 2005).

A su vez las especies *Lb. brevis*, y *Lb. casei* forman parte de la comunidad de lactobacilos responsables de la fermentación y envejecimiento de queso Pecorino que es un queso curado de origen italiano, elaborado a partir de leche de oveja (Cappello *et al.*, 2001). *Es importante señalar que* las especies antes mencionadas junto con *Lb. paracasei* forman parte de las NSLAB (bacterias ácido lácticas no iniciadoras) halladas en pequeñas cantidades, al inicio del proceso en quesos las cuales tienden a incrementar durante el tiempo de maduración. Las NSLAB pueden tolerar un ambiente hostil en el queso durante la maduración; el cual se caracteriza por una humedad baja (32-39%), concentración de NaCl entre 4-6%, pH 4.9 a 5.3, y deficiencia de nutrientes (Fryer & Sharpe, 1996; Gobbetti *et al.*, 1999).

Weissella

Microorganismo	Cepa	Total
<i>Weissella confusa</i>	P, N	2

ORGANISMO *Weissella confusa*

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Leuconostocaceae; Weissella

El género *Weissella* surgió de la reclasificación de *Leuconostoc paramesenteroides* y de algunos lactobacilos heterofermentativos "atípicos" (Collins, Samelisl, Metaxopoulos, y Wallbanks, 1993). La especie *W. cibaria* fue descrita en el año 2002 y está estrechamente relacionada con *Weissella confusa* (Björkroth *et al.*, 2002).

Las especies de *Weissella* poseen hábitats variables, pero están asociadas principalmente a alimentos fermentados (Huys, Leisner, y Björkroth, 2012). Existen reportes que vinculan a *W. cibaria* y *confusa* con la microbiota natural de masas fermentadas (Galle, Schwab, Arendt, y Gänzle, 2010), sin embargo también pueden encontrarse en intestino humano y heces fecales, respectivamente (Huys *et al.*, 2012). Así mismo *W. confusa* también ha sido detectada en jugos de caña de azúcar, zanahoria, ocasionalmente en leche bronca y aguas residuales (Hammes & Vogel, 1995).

En estudios recientes se reportó la presencia de *W. confusa* en alimentos originarios de Malasia, como el Tapai y el Chili Bo. Particularmente el Tapai es un alimento fermentado dulce, de consistencia glutinosa de arroz o yuca; en cambio el Chili Bo es un alimento no fermentado que contiene chile y almidón de maíz (Björkroth et al., 2002).

Di Cagno *et al.* en 2006 (b) encontró que los quesos elaborados con *W. confusa* como agente coadyuvante contenían altas cantidades de ácidos grasos libres y una considerable actividad de aminopeptidasa en comparación con otras cepas de NSLAB aisladas de queso.

La especie *W. confusa* se caracteriza ser Gram positiva, catalasa negativa, que produce gas a partir de glucosa, regularmente se encuentra en forma de cocos, puede crecer a diferentes temperaturas, (15°, 37° y 45 °C), tolera un porcentaje de NaCl del 6.5% y se caracteriza por la producción de dextrano y ácido láctico (isómeros D y L).

Con la metodología propuesta en este trabajo no fue posible el aislamiento de la especie *W. paramesenteroides*, considerada “dominante” en el queso Cotija, sin embargo se logró el aislamiento e identificación de la especie *W. confusa* (cepas N y P). Escobar en 2016 detectó por primera vez este género en el queso Cotija madurado, donde reporta dominancia atípica, y considera que la presencia de dicho género junto con *Leuconostoc* podría ser considerados una firma distintiva del queso Cotija Región de Origen.

De acuerdo con los objetivos, se planteaba aislar cepas del género *Leuconostoc*, principalmente la especie *L. mesenteroides* sin embargo, los medios y condiciones utilizadas no fueron las más adecuadas y favorables para dicho género. Se pensó que el medio MRS con un pH de 4, permitiría el desarrollo de éste, e inhibiría el crecimiento del género *Enterococcus*. Es probable que éste género se encuentre en cantidades inferiores en las muestras seleccionadas lo que hace más difícil su

recuperación. Además podría presentar altos requerimientos nutrimentales que son deficientes en los medios en los que se ha cultivado.

Asimismo es posible considerar que su metabolismo sea dependiente de otros miembros de la comunidad, lo que haría imposible su aislamiento en el queso.

Pediococcus

Microorganismo	Cepa	Total
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	W	1

ORGANISMO *Pediococcus pentosaceus*

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Pediococcus.

El género *Pediococcus* pertenece al grupo de las BAL, se ha descrito como un grupo de bacterias Gram positivas, inmóviles, no encapsuladas, homofermentativas que utilizan la vía de Embert-Meyerhoff-Parnas al convertir 1 mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico, además producen más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa, anaerobias facultativas, cuyas células esféricas forman principalmente tétradas, aunque también se les encuentra formando pares. Son catalasa negativas y no son patógenas a las plantas y animales (Huertas 2010). Las colonias varían de 1 a 2.5 mm de diámetro, son lisas redondeadas, de color grisáceo. Todas las especies crecen a los 30 °C, pero las temperaturas óptimas se encuentran entre 25° y 40 °C (Rivera, 2004).

Este género ha sido usado como cultivo iniciador en la fermentación de carne y vegetales (Dacre, 1958a; Litopoulou-Tzanetaki *et al.*, 1989a). *P. pentosaceus* suele encontrarse en cantidades altas en leche y productos lácteos, a diferencia de *P. acidilactici*. Sin embargo el rol de éste en la maduración del queso no ha sido explicado en su totalidad, en su lugar se sabe que trabaja sinérgicamente junto con otras BAL afectando el sabor del queso (Franklin and Sharpe, 1963; Peterson and Marshall 1990; Beresford, 2003).

Estudios anteriores reportan el aislamiento de la especie *P. pentosaceus* de un queso de tipo granja como una especie constituyente en este alimento (Garvie, 1984, 1986; Litopoulou-Tzanetaki *et al.*, 1989a). Juega un papel importante en la bioconservación de alimentos mediante la producción de distintas pediocinas (péptidos antimicrobianos) que actúan contra microorganismos patógenos como: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum*. Posee la capacidad de fermentar diferentes tipos de hidratos de carbono tales como glucosa, galactosa, maltosa y lactosa (Raccach 1987; Agrawal *et al.*, 2000). Sin embargo la fermentación de la lactosa por *P. pentosaceus* es específica, ya que el género *Pediococcus spp.* es considerado “típicamente incapaz” de fermentar éste tipo de carbohidrato (Caldvell SL. *et al.*, 1996; Garvie EI. 1986).

Pese a que el género *Pediococcus* no se encuentra dentro de los tres géneros dominantes en queso Cotija, por análisis metagenómico se reportó la presencia de dicho género como parte de la población que representa menos del 1% en este alimento fermentado (Escobar, 2016), por lo que su identificación en éste trabajo sustenta su presencia.

VIII. CONCLUSIONES

- 👤 Se logró el aislamiento de dos géneros: *Weissella* y *Lactobacillus* reportados como dominantes en queso Cotija.
- 👤 El medio realizado a partir de un extracto acuoso de queso Cotija, permitió la recuperación, el aislamiento y la identificación del género *Weissella*, en especial de la especie *W. confusa* a partir de una mezcla de quesos Cotija, previamente seleccionados.
- 👤 La utilización de medios comerciales como el medio MRS (Man Rogosa and Sharpe), y la modificación de condiciones como pH, temperatura y oxígeno favoreció la recuperación y el aislamiento de las siguientes especies: *Lb. brevis*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei*, *P. pentosaceus* (especie de muy baja abundancia) y *E. faecium* (especie subdominante).

IX. PERSPECTIVAS

- 👤 Realizar la identificación de cepas bacterianas aisladas bajo condiciones de cultivo con pH alto (pH=9) y altas concentraciones de cloruro de sodio (7%), recuperadas de medios comerciales (MRS) y del medio elaborado a partir de un extracto acuoso de queso Cotija.
- 👤 Determinar los compuestos presentes en el extracto acuoso de queso Cotija, con el fin de elucidar y proponer un medio de cultivo que favorezca el desarrollo del género *Leuconostoc*.
- 👤 Identificar las levaduras aisladas con el fin de enriquecer los resultados descritos en años anteriores.
- 👤 Realizar una re-secuenciación de las cepas identificadas con la secuencia del forward o reverse, con el fin de verificar que sea la misma cepa.

X. Anexos

1. Tinción de Gram (Manual de Técnicas para el análisis Microbiológico de Alimentos. 2^a ed. Facultad de Química. UNAM)

1. Se prepararon los frotos bacterianos a partir del cultivo líquido.
2. Se fijó el frote con calor (mechero)
3. Se agregó crista violeta en cantidad suficiente para cubrir el frote (2 o 3 gotas) y se dejó actuar 1 minuto.
4. Se lavó con agua para eliminar el exceso de colorante.
5. Se agregó lugol en cantidad suficiente para cubrir el frote (2 o 3 gotas) y se dejó actuar 1 minuto.
6. Se lavó con agua para eliminar el exceso de mordente.
7. Se decoloró con alcohol acetona hasta que el efluente fuera incoloro.
8. Se lavó con agua para eliminar el exceso de disolvente.
9. Se agregó safranina en cantidad suficiente hasta cubrir el frotis (2 ó 3 gotas) y se dejó actuar 1 minuto.
10. Se lavó con agua para eliminar el exceso del colorante en contraste.
11. Se dejó secar la preparación a temperatura ambiente.
12. Finalmente se observó al microscopio con los objetivos de 10X, 40X y 100X.

2. Conservación de cepas

1. Tomar 800 μ L del cultivo (medio MRS o extracto acuoso de queso Cotija).
2. Colocar en viales criogénicos, de 2 mL.
3. Adicionar 200 μ L de glicerol al 80% (previamente esterilizado).
4. Almacenar a -20°C.

3. Protocolo de extracción de ADN kit Fast ID.

1. Del medio donde se hizo crecer el inóculo (50 mL de medio MRS).
2. Centrifugar a 8 500 rpm durante 10 minutos. Lavar con solución salina estéril 0.85% y repetir el paso de centrifugación (>10 000 rpm). Realizar dos lavados.
3. Re suspender el pellet en 1.5 mL de solución salina 0.85% estéril y centrifugar en las mismas condiciones. Pesar el pellet y su peso deberá encontrarse dentro de dicho intervalo 1>250 mg
4. Para cada extracción adicionar 1 mL de buffer de lisis, 10 µL de proteinasa K y de lisozima. Homogeneizar
5. Incubar durante 15 minutos a 37°C y enseguida a 65°C por 20 minutos.
6. Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 minutos.
7. Tomar 500 µL del sobrenadante y transferir a un tubo de 2 mL.
8. Adicionar una cantidad de 500 µL de buffer de unión. Homogeneizar.
9. Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 minutos.
10. Pasar el sobrenadante a través de la columna de unión de ADN.
11. Lavar con 800 µL de buffer de lavado. Centrifugar 1 minuto a 10 000 rpm.
12. Lavar 3 veces con etanol al 75% (800 µL). Centrifugar 1 minuto a 10 000 rpm entre cada lavado.
13. Repetir el paso de centrifugación con el fin de eliminar el etanol restante.
14. Colocar la columna en un tubo de 1.5 mL.
15. Añadir 50 µL de buffer 1xTE previamente atemperado (65°C)
16. Incubar a 65°C durante 10 minutos
17. Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 rpm, para eluir y coleccionar el ADN.
18. Conservar el ADN coleccionado a -20 °C.

4. Concentración de ADN

Muestra	A260/280	Concentración ng/µL
T1	2.1	51.0890
T2	2.0	54.9740
T3	2.1	45.8170
T4	2.1	39.7020
T5	2.0	26.0120
T6	2.0	32.8930

A	2.0	38.5260
B	1.9	27.3300
C	2.0	28.8320
D	2.0	43.6830
E	2.1	21.2920
F	2.0	19.0660
G	2.0	15.4650
H	2.0	17.3610
I	2.1	22.7370
J	1.8	18.4520
K	2.0	20.4960
L	1.8	20.6930
M	1.9	36.4060
N	2.0	72.0270
O	1.8	84.9210
P	1.8	49.3810
Q	1.9	31.1700
R	2.1	49.2190
S	1.9	168.6450
T	1.9	140.1170
V	1.9	137.9115
W	2.0	29.9085
X	2.0	130.9730

5. Protocolo de purificación de productos amplificados de PCR (DNA Clean & Concentrator™ -5. (de Zymo Research)

1. Ajustar volumen total de amplicones a 100 µL y adicionar de 500 µL del Binding Buffer. Mezclar con ayuda del vortex.
2. Colocar una columna de purificación dentro de un tubo colector y transferir la muestra en la parte superior. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad.
3. Descartar la solución del tubo colector. Insertar de nuevo la columna dentro del tubo colector.
4. Adicionar 200 µL de Wash Buffer a la columna. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad. Repetir este paso.
5. Descartar la solución del tubo colector. Insertar la columna en un tubo estéril de 1.5 mL. Adicionar 50 µL de Elution Buffer (precalentado a 65 °C) a la columna. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad.

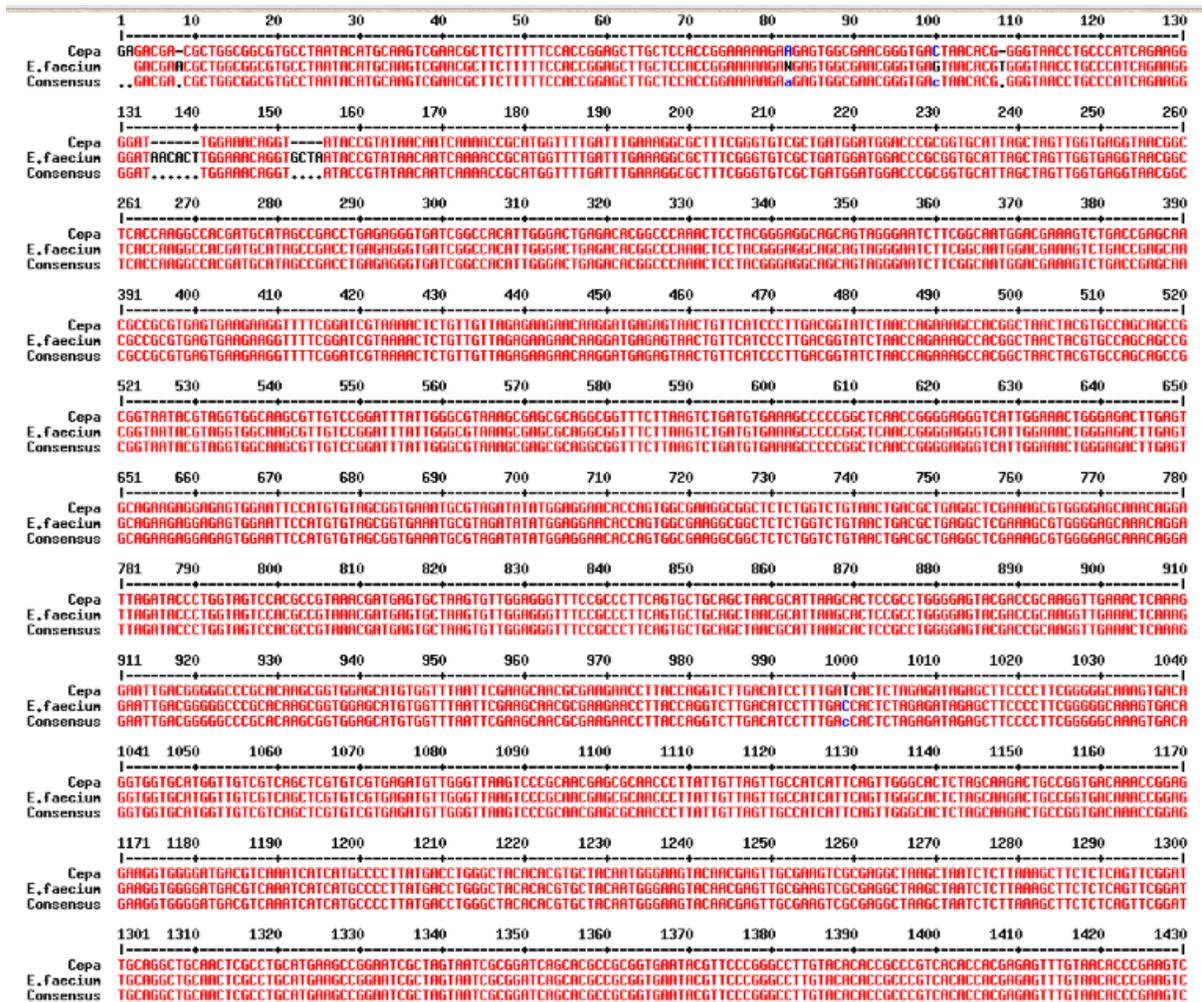
El tubo ahora contiene el producto amplificado puro.

6. Secuencias del gen ribosomal 16S

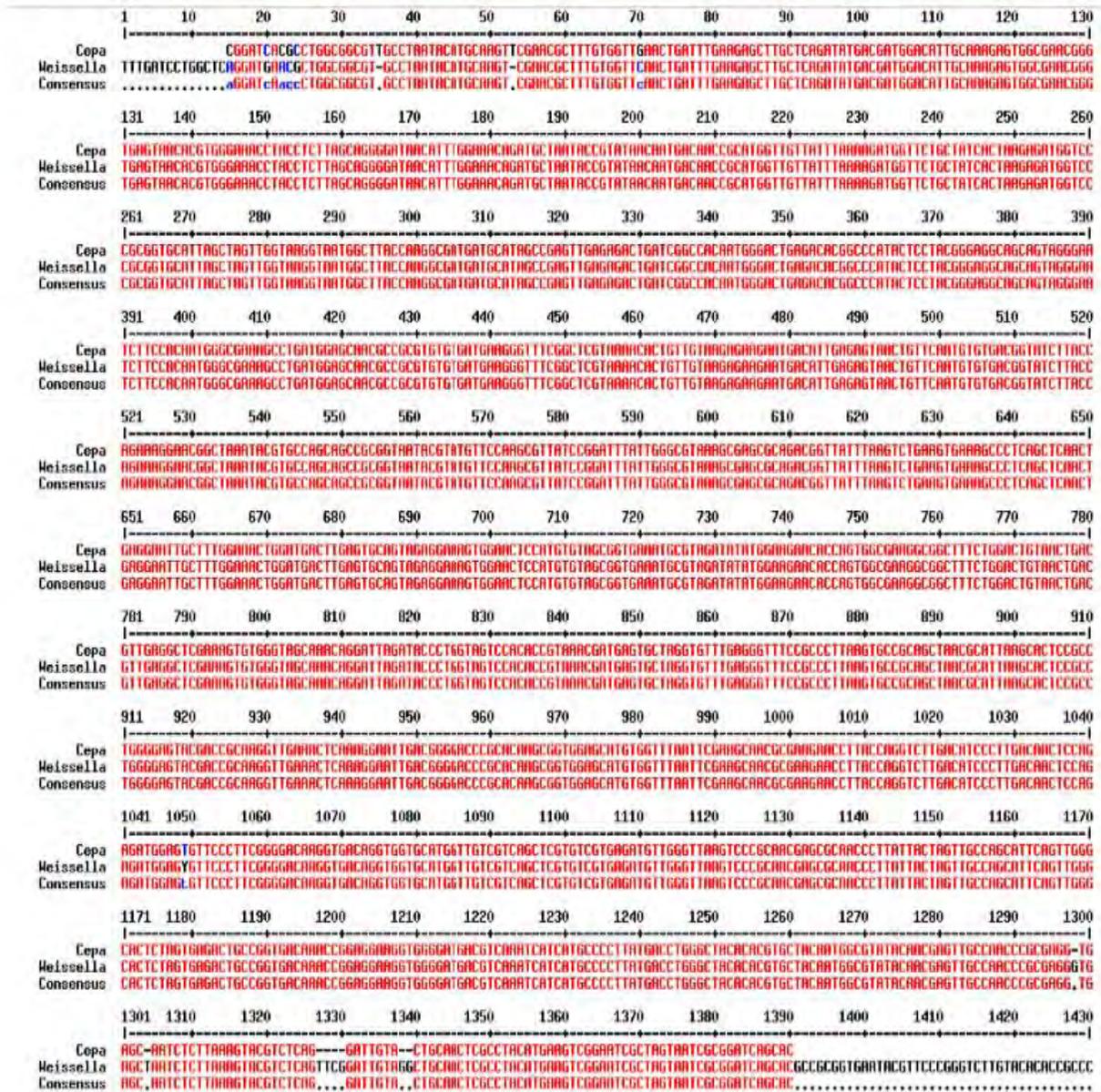
Para mayor información respecto a las secuencias completas (forward y reverse) de las cepas identificadas en el presente trabajo favor de solicitar el acceso a estas escribiendo un email dirigido a la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch a la siguiente dirección electrónica quirabma@unam.mx.

7. Alineamientos de las secuencias consenso

Alineamiento de la secuencia consenso de la cepa E contra *E. faecium* ATCC 70221



Alineamiento de la secuencia consenso de la cepa P contra *Weissella confusa* NH02



Alineamiento de la secuencia consenso de la cepa X contra *Lactobacillus brevis* KB290

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
Cepa lb.		GTCCGACG	CCCTTGGCGCATGCC	TAAATACATGCAAGT	TCCGAAACAGGCTTCCGTT	GAATGACGTGCTTGCACCT	GAAT	TTAACA	TGAAGCCAGT	TGGCGA	ACTTGG	GAATTA	TGAAGCCAGT	TGGCGA	ACTTGG
Consensus		GTCCGACG	CCCTTGGCGCATGCC	TAAATACATGCAAGT	TCCGAAACAGGCTTCCGTT	GAATGACGTGCTTGCACCT	GAAT	TTAACA	TGAAGCCAGT	TGGCGA	ACTTGG	GAATTA	TGAAGCCAGT	TGGCGA	ACTTGG
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
Cepa lb.		CACGTGGGAAATCTGCC	CGAAGCAGGGATTAACAC	TGAAACAGGTC	TAAATACGCTATACAC	ACAAATCCGCA	TGGATTTGTT	GAAGGATGGCTTC	CGCTATACCT	TC	GAATGATCCCGG	CC	CACGTGGGAAATCTGCC	CGAAGCAGGGATTAACAC	TGAAACAGGTC
Consensus		CACGTGGGAAATCTGCC	CGAAGCAGGGATTAACAC	TGAAACAGGTC	TAAATACGCTATACAC	ACAAATCCGCA	TGGATTTGTT	GAAGGATGGCTTC	CGCTATACCT	TC	GAATGATCCCGG	CC	CACGTGGGAAATCTGCC	CGAAGCAGGGATTAACAC	TGAAACAGGTC
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	
Cepa lb.		GTATTAGTTAGTTGG	TGAGGTAAAGCCCA	CCAGAGCATGATACG	TAGCCGACCTTGAG	GGGTAA	TCGGCCACAT	TGGGCTGAG	ACAGCCCAACT	CTAC	CGGAGCAGGAT	AGGGAAATCTCC	GTATTAGTTAGTTGG	TGAGGTAAAGCCCA	
Consensus		GTATTAGTTAGTTGG	TGAGGTAAAGCCCA	CCAGAGCATGATACG	TAGCCGACCTTGAG	GGGTAA	TCGGCCACAT	TGGGCTGAG	ACAGCCCAACT	CTAC	CGGAGCAGGAT	AGGGAAATCTCC	GTATTAGTTAGTTGG	TGAGGTAAAGCCCA	
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	
Cepa lb.		ACATGGACGAAATCTGAT	GGGCAATGCCCGT	GTGTAAGAGGGTTCCG	CTGTAAACTTGT	TTAAGAGAAAC	CCCTTGG	GTACCT	TGAGGAT	TTA	ACAGGAT	TTA	ACAGGAT	TTA	
Consensus		ACATGGACGAAATCTGAT	GGGCAATGCCCGT	GTGTAAGAGGGTTCCG	CTGTAAACTTGT	TTAAGAGAAAC	CCCTTGG	GTACCT	TGAGGAT	TTA	ACAGGAT	TTA	ACAGGAT	TTA	
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	
Cepa lb.		CCGCGCTAAC	TACCTGCCGACG	CCCGGTAATAC	GATAGGTCGAGGCTTG	TCGGATTTAT	TGGCGTAAAG	CAGGAGGCTT	TTAAGCT	GAT	TGAAGCT	TCGGCT	TACCGGAA	CCGCGCTAAC	
Consensus		CCGCGCTAAC	TACCTGCCGACG	CCCGGTAATAC	GATAGGTCGAGGCTTG	TCGGATTTAT	TGGCGTAAAG	CAGGAGGCTT	TTAAGCT	GAT	TGAAGCT	TCGGCT	TACCGGAA	CCGCGCTAAC	
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	
Cepa lb.		GTGATCGAAAC	TGGGAACTTGG	TGCAAGAAAGCA	GTGAAAC	CCATG	TGAGGATGAAT	GGCTAGATTA	AGAAAC	CCAGTGG	CGAAGCCG	CTGAGCT	GTAC	GAGCTGG	
Consensus		GTGATCGAAAC	TGGGAACTTGG	TGCAAGAAAGCA	GTGAAAC	CCATG	TGAGGATGAAT	GGCTAGATTA	AGAAAC	CCAGTGG	CGAAGCCG	CTGAGCT	GTAC	GAGCTGG	
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910	
Cepa lb.		GC	TCGAAGCA	TGGTACGAA	AGGATAGATAC	CCGTAGT	CAATCCGTA	AAAGATAG	GTGCTAG	GT	TGGGGTT	CCGCC	TTAGG	GTGAG	TAAGCA
Consensus		GC	TCGAAGCA	TGGTACGAA	AGGATAGATAC	CCGTAGT	CAATCCGTA	AAAGATAG	GTGCTAG	GT	TGGGGTT	CCGCC	TTAGG	GTGAG	TAAGCA
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	
Cepa lb.		GTACAGCCGAA	GTAAAC	TCAGAGGAT	TGAGGGCC	CCAGCAGG	CGTGAAG	ATGAT	TTAAT	TCAGAC	TCAGAGGAT	TACAGGCT	TGAC	ACTTGA	
Consensus		GTACAGCCGAA	GTAAAC	TCAGAGGAT	TGAGGGCC	CCAGCAGG	CGTGAAG	ATGAT	TTAAT	TCAGAC	TCAGAGGAT	TACAGGCT	TGAC	ACTTGA	
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	
Cepa lb.		GACCTCCCT	TCGAGCA	CAATGAC	GGTGGT	GTCTGAC	GGTGGTGGAT	GTGGTGGAT	GGTGGAT	GGTGGAT	GGTGGAT	GGTGGAT	GGTGGAT	GGTGGAT	
Consensus		GACCTCCCT	TCGAGCA	CAATGAC	GGTGGTGGTGGAT	GGTGGAT	GGTGGAT	GGTGGAT	GGTGGAT	GGTGGAT	GGTGGAT	GGTGGAT	GGTGGAT	GGTGGAT	
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	
Cepa lb.		GGTAAC	TGCCG	TACCAACCG	GGAGGTGGGA	TACCTCA	CAATACCCCT	TATGAC	TGGCTAC	ACCTG	ACAA	TGGCG	GTACAC	AGAT	
Consensus		GGTAAC	TGCCG	TACCAACCG	GGAGGTGGGA	TACCTCA	CAATACCCCT	TATGAC	TGGCTAC	ACCTG	ACAA	TGGCG	GTACAC	AGAT	
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	
Cepa lb.		TCCT	TAAAGC	CTCT	CGTT	CGAT	TGAGGCT	GCACCT	CAAT	TGAGT	TGGAT	CGT	TAGT	AT	
Consensus		TCCT	TAAAGC	CTCT	CGTT	CGAT	TGAGGCT	GCACCT	CAAT	TGAGT	TGGAT	CGT	TAGT	AT	
	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1558	
Cepa lb.		CCATGAG	GT	TTGTA	ACCCAA	AGCCGG	TAGAT	ACCTTC	GGAG	TCAGCC	CT	TAGG	TGG	ACAG	
Consensus		CCATGAG	GT	TTGTA	ACCCAA	AGCCGG	TAGAT	ACCTTC	GGAG	TCAGCC	CT	TAGG	TGG	ACAG	

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, R., Barragán, López E., & Chombo Morales P., (2005) Reglas de uso. Marca colectiva Queso Cotija Región de Origen MR. México: Asociación Regional de Productores de Queso Cotija
- Agrawal R, RatiRao E, Vijayendra SVN, Varadaraj MC, Prasad MS, Nand K (2000) Flavour profile of idli batter prepared from defined microbial starter cultures. *World J Microbiol Biotechnol* 16:687–690
- Ams, M (2004). El libro del sauerkraut. Industrial Kadex S.A. Ediciones Cedel. 2nd Ed. 98 pp.
- Becerra M. (2013). Detección de *Listeria monocytogenes* en queso Cotija artesanal madurado. Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Química. México.
- Beganović, J., Koss, B., Lebos Pavunc, A., Uroic, K., Jokić, M., Susković, J. (2014). Traditionally produced sauerkraut as a source of autochthonous functional starter cultures. *Microbiological Research*. 169: 623-632.
- Beresfod, T., Fotsimons, N., Brenan, N., and Cogan, T., (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11:259-54
- Beresfod, T. P. (2003). Non-starter acid bacteria (NSLAB) and cheese quality. *Dairy Process: Improv. Qual.* 448-169 (CAB).
- Bohinski R. (1991). *Bioquímica*. Pearson Education, México.
- Bozoudi, D., Torriani, S., Zdragas, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., (2016). Assessment of microbial diversity of the dominant microbiota in fresh and mature PDO Feta cheese made at three mountainous areas of Greece. *Food Science and Technology*. Vol. 72 pp. 525-526
- Björkroth, K. J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W. H., et al. (2002). Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 141-148
- Björkroth J & Holzapfel W (2006) Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *Prokaryotes*. 4:267-319. doi 10.1007/0-387-30744-3_9

- Bravo A. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas del queso Cotija. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Bridson E.Y. (1990) The OXOID Manual 6th Ed. Alphaprint, Alton, Hanst. United Kingdom
- Brown-Elliot BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ Jr. (2002). Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev. 2006; 19: 259-82
- Byong H. Lee (2000). Fundamentos de Biotecnología de Alimentos. Ed. Acribia . España. pp. 239-246
- Chamba, J.F., and Irlinger, F. Secondary and adjunct cultures. In: P.F. Fox P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee (Eds.) (2004). Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology. Elsevier, London, UK; 191–206.
- Chavasirikunton, V., Vatanyoopaisarn, S. y Phalakornkule, C. (2006). Bacteriocin-like activity from *Weissella confusa* and *Pediococcus acidilactici* isolated from traditional Thai fermented sausages, Journal of culture collection, Vol. 5 pp.64-72.
- Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. Journal Microbiol Methods. 2007; 69(2): 330-9.
- Checulli, M., Daniel, J.L.P., Zwielehner, J., Junges, D., Fernandes, J., Nussio, L.G. (2015). The effects of *Lactobacillus Kefiri* and *Lb. brevis* on the fermentation and aerobic stability of sugarcane silage. Animal Feed Science and Technology. 205: 69-74.
- Chellapandian M, Larios C, Sanchez-Gonzalez M, Lopez-Munguía A (1998) Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from “pulque”, a traditional Aztec alcoholic beverage. J Ind Microbiol Biotechnol 21:51–56
- Caldwell SL, McMahon DJ, Oberg GJ, Broadbent JR (1996) Appl. Environ Microbiol 62:936–941

- Cai H, Archambault M. Prescott JF. (2006). 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria J Vet Diagn. Invest 2003; 15 (5): 465-9
- Capello MS., Laddomada B., Poltronieri P., Zacheo G. (2001). Characterization of lab in typical Salento Pecorino cheese; 66(3b):569-72.
- Carr, F. J., Chill, D., y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. Critical Reviews in Microbiology. 28 (4): 281-350
- Centeno JA, Menendez S, Hermida MA and Rodr y' guez-Otero JL (1999) Effects of the addition of Enterococcus faecalis in Cebreiro cheese manufacture. Int J Food Microbiology 48:97–111.
- Centeno JA, Menendez S and Rodriguez-Otero JL (1996) Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). Int J Food Microbiology 33:307– 313.
- Clarridge JE III. (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical Microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev; 17(4): 840-62.
- Cogan, T. M., M. O'Dowd, and D. Mellerick. (1981). Effects of Sugar on Acetoin Production from Citrate by *Leuconostoc lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, no. 1: 1-8
- Collins, D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. y Wallbanks, S. (1993). Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides group of species. Journal of Applied Bacteriology. pp.595-603.
- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., y Vernoux, J. P. (2003). Isolation characterisation Lactobacillus focusing mainly on cheeses and other dairy products. Lait 83, 269-305.
- Coppola S, Parente E, Dumontet S and Lapeccerella A (1998) The Microfl ora of Natural Whey Cultures Utilized as Starters in the Manufacture of Mozzarella Cheese from Water-Buffered Milk. Lait 68(3):295–309.
- Das S, Dash HR, Mangwani N, Chakraborty J, Kumari S., (2014) Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches

for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *J Microbiol Methods*; 103:80-100.

- Dacre, J. C., (1958a). Characteristics of a presumptive *Pediococcus* occurring in New Zealand Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 25 409-413.
- De Vos, W. (2004). Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria. *Trends in Biotechnology.* 22, 72-79.
- Dellaglio, F., Vescovo, M., Morelli, L. & Torriani, S. (1984). Lactic acid bacteria in ensiled high-moisture corn grain: physiological and genetic characterization. *Systematic and Applied Microbiology.* Vol. 5, pp.534-544.
- Dellaglio, F. & Torriani, S. (1986) DNA-DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria from maize silage. *Journal of Applied Bacteriology.* Vol. 60, pp.83-93.
- Díaz, G y Wachter, C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología,* Vol. 45 No. 1-2: 30-40.
- Di Cagno, R., Quinto, M., Corsetti, A., Minervini, F., & Gobbetti, M. (2006b). Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *International Dairy Journal,* 16, 119-130.
- Endo, A. y Okada, S (2008). Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov., and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 58, 2195-2205.
- Ennhar, S., Aoude-Werner, D., Assobhei, O., Hasselmann, C., (1998) Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *J. Appl. Bacteriol.* 85 521-526.
- Escobar, A. (2012). Estudio de la distribución espacial de la microbiota bacteriana en queso Cotija por la técnica de FISH. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM. México D.F.

- Escobar, A. (2016). Análisis taxonómico y funcional del metagenoma bacteriano de queso Cotija. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM. México D.F.
- Espinosa L. (2007.) Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L., V. Souza y X. Aguirre (comps.). Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., México, pp. 517-526.
- Evans and Niven, 1951, J. Bact., 62:599.
- Felis, G. & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. Curr. Issues Intestinal Microbiol.8:44–61.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limitson phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. 30: 783-791.
- Fernández A., García C., Sáenz J., Valdezate S. (2010). Procedimientos en Microbiología Clínica: Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología. Disponible en <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf> Consultado el 27/08/2016.
- Fernández P. (2009). Identificación de levaduras en el Queso Cotija por métodos moleculares dependientes e independientes de cultivo (ARDRA, RFLP Y DGGE). Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química UNAM, México D.F
- Fernández, E. E., y Hernández M. C. (1985). Aplicación del medio APN en el recuento de bacterias lácticas en quesos frescos no pasteurizados y requesones. 26:47-51
- Foulquie-Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. International Journal of Food Microbiology. 106: 1-24.
- Fox F. Patrick. *et al.*, (2000). Fundamentals of Cheese Science. Aspen Publication. USA pp. 153-154, 163-164, 206-209, 236-237, 537.

- Franz C., Stiles M. y Holzapfel W. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol.* 1;88 (2-3): 105-22.
- Franklin, J. G., Sharpe, M. E. (1963). The incidence of bacteria in milk and Cheddar cheese and their association with flavor. *J Dairy Res.* 30, 87-99.
- Freitas AC, Pais C, Malcata FX and Hogg TA (1995) Microbiological characterization of Picante de Beira Baixa cheese. *J Food Prot* 59:155–160.
- Fusco V., Quero G.M., Cho Gyu-Sung, Kabisch J., Meske D., Neve H., Bockelmann W., Franz C. (2015). The genus *Weissella*: taxonomy, ecology, and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology.* Vol. 6, pp. 1-2.
- Fryer, T. F., and M. E. Sharpe. (1966). *Pediococci in Cheddar cheese.* *J. Dairy Res.* 33:325–331.
- Galle, S., Schwab, C., Arendt, E., & Ganzle, M. (2010). Exopolysaccharide-forming *Weissella* strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5834-5841.
- García V. (2011). Detección de microorganismos lipolíticos durante las etapas de elaboración de un queso artesanal, mediante técnicas moleculares. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. México.
- García Garibay M., Quintero Ramírez R., López-Munguía Canales A., (2004). *Biología alimentaria.* Editorial Limusa S.A. de C. V. Grupo NORIEGA EDITORES. Quinta reimpression. México D.F.
- Garg, S. K. y Mital, B. K. (1991). Enterococci in Milk and Milk Products. *Critical Reviews in Microbiology.* 18 (1): 15-45.
- Garvie, E. T., (1984). Taxonomy and identification of bacteria important in cheese and fermented dairy products. In: Davies, F. L., Law, B. A. (Eds.) *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk.* Elsevier Applied Science Publication Ltd, London, pp. 57.
- Garvie, E. T., (1986). Genus *Pediococci*. In Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. S., Holt, J. G. (Eds), *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, vol. 2 William & Wilkins, London, pp. 1075-1079.
- Ghasemi M., Najafpour G., Rahimnejad M., Aeineh Beigi P., Sedighi M., Hashemiyeh B. (2009). Effect of different media on production of lactic acid

from whey by *Lactobacillus bulgaricus*. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (1) pp. 081-082.

- Giraffa G., (2003). Functionality of enterococci in dairy products. International Journal of Food Microbiology 88, 215-222.
- Gobbetti, M., B. Folkertsma, P. F. Fox, A. Corsetti, E. Smacchi, M. De Angelis, J. Rossi, K. Kilcawley, and M. Cortini. (1999). Microbiology and biochemistry of Fossa (pit) cheese. Int. Dairy J. 9:763–773.
- Goossens D., Jonkers D., Stobberingh E y Stockbrugger R. (2005). The effect of the probiotic *L. plantarum* 299v on the faecal and mucosal bacterial flora of patients with inactive ulcerative colitis. Eur Gastroenterol Hepatol; 17 A62-A62.
- Griffiths A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin y W.M. Gelbart (1993). Genetic Analysis. Freeman. New York.
- Guzmán, A. (2015) Estudio genético poblacional de cepas de *Enterococcus faecium* aislados de queso Cotija artesanal madurado. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM, México D.F.
- Hammes WP & Vogel RF (1995). The genus *Lactobacillus*. The Genera of Lactic Acid Bacteria, Vol. 2 (Wood BJB & Hozapfel WH, eds), pp19-54 Blackie Academic & Professional Glasgow, UK.
- Hernández I. (2012). Detección de *Salmonella spp.* en queso Cotija artesanal madurado por PCR en tiempo real. Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Química. México.
- Holt, G. J., Krieg R. N., Sneath A. Staley T.J., Williams, T.S. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Novena Edición. EUA.
- Huertas, R. A. (2010). Reviw Lactic Acid Bacteria: Functional role in foods. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8 (1), 93-105.
- Huys, G., Leisner, J., & Björkroth, J. (2012). The lesser LAB gods: *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, and affiliated genera. In S. Lahtinen, A. C. Ouwehand, S. Salminen, & A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (4th ed.). (pp. 93-121) Boca Raton, FL, USA: CRC Press.

- Jay, J., Loessner, M. y Golden, D. (2005). Modern Food Microbiology. Editorial Springer. Séptima Edición, New York, USA.
- Jensen JP, Reinbold GW, Washam CJ and Vedamuthu ER (1975a) Role of enterococci in Cheddar cheese: free fatty acid appearance and citric acid utilization. J Milk Food Technol 38:78– 83.
- Jensen JP, Reinbold GW, Washam CJ and Vedamuthu ER (1975b) Role of enterococci in Cheddar cheese: proteolytic activity and lactic acid development. J Milk Food Technol 38:3 – 7.
- Kandler, O. & Weiss, N. (1992). Regular nonsporing Gram-positive rods. En P. H. A. Sneath, M. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G.
- Kandler, O., Weiss, N. (1986). Genus Lactobacillus En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2 Williams and Wilkins Publications. Baltimore pp.1209-1234.
- Kleppe K., E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux y H.G. Khorana. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic ADN's as catalyzed by ADN polymerases. Journal of Molecular Biology 56: 341–361.
- Kompanje, E.J.O., Jansen, T.C., Van Der Hoven., B., & Bakker, J. (2007). The first demonstration of lactic acid in human blood in shock by Johann Joseph Scherer (1814-1869) in January 1843. Intensive Care Medicine, Vol. 33, pp. 1967-1971.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets (submitted).
- Lähteinen T, Lindholm A, Rinttilä T, Junnikkala S, Kant R, Pietilä TE, Levonen K, von Ossowski I, Solano-Aguilar G, Jakava-Viljanen M, Palva A. (2014). Effect of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 as a feeding supplement on the performance and immune function of piglets. Vet Immunol Immunopathol 158:14–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.09.002>.
- Law and Kolstad (1983). Microbiology and Biochemistry of cheese and fermented milk. Second Edition. Chapman and Hall pp. 296-308.

- Laukova , A., Czikkova, S., (2001). Antagonistic effect of enterocin CCM 4231 from *Enterococcus faecium* on “bryndza”, a traditional Slovak dairy product from sheep milk *Microbiological Research* 156, 31-34.
- Lee K.W., Shim J.M., Park S.-K., Heo H.J., Kim H.J., Ham K.S. (2016). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. *Vol. 71*, pp. 130-133.
- Leisner, J.J., B. Pot, H. Christensen, G. (1999). Identification of lactic acid bacteria from chilibo, a Malaysian food ingredient. *Applied and Environmental Microbiology*. *Vol.65*, pp.599-605.
- Leveau, J. Y., y Bouix, M. (2000). *Microbiología industrial. Los microorganismos de interés industrial*. Ed. Acribia.
- Litopoulou-Tzanetaki, E, Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Tzanetkis, N., (1989 b). Biotechnologically important metabolic activities of *Pediococcus* isolates from milk and cheese. *Microbiol-Aliment-Nutr.* 7 113-122.
- Litopoulou-Tzanetaki, E, Tzanetakis N and Vafopouloumastrojiannaki A (1993) Effect of the Type of Lactic Starter on Microbiological Chemical and Sensory Characteristics of Feta Cheese. *Food Microbiol* 10(1):31–41.
- Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L.K., Eliskases-Lechner, F., Prillinger, H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, 23 (4): 341-350.
- Manual Fast ID Genomic DNA Extraction, disponible en: http://www.fastidkit.com/Products/Genomic_DNA_Extraction_Kit/Protocol.
- Marilley, L., Casey, M.G., (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* 90, 139-159.
- Martinez P. (2009). Identificación de levaduras en el queso Cotija por métodos moleculares dependientes e independientes de cultivo (ARDRA, RFLP y DGGE).
Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. UNAM. México.

- Maisnier-Patin S., Forni, E., Richard J., (1996). Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *International Journal of Food Microbiology* 30, 255-270.
- Mannu, L. and Paba, A. (2002) Genetic diversity of lactococci and enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo ewes' milk cheese. *J Appl Microbiol* 92:55–62.
- Martínez L. (2007). Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. En *Ecología molecular*(87-89). México, D.F.: IEPSA.
- Martino G. P., Quintana I. M., Espariz M., Blancato V. S., Magni C. (2015). Aroma compounds generation in citrate metabolism of *Enterococcus faecium*: Genetic characterization of type I citrate gene cluster. *Int J. of Food Microbiol.* 31:12-16.
- Mejía H. (2013). Detección de cepas patogénicas de *Escherichia coli* en queso Cotija artesanal madurado producido en la región de origen, mediante la técnica de PCR tiempo real. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. UNAM. México.
- Menendez S, Godýnez R, Centeno JA and Rodríguez Otero JL (2001) Microbiological, chemical and biochemical characteristics of “Tetilla” raw cows-milk cheese. *Food Microbiology* 18:151–158
- Milbourne, K., (1983). Thermal tolerance of *Lactobacillus viridescens* in ham. *Meat Science*. Vol. 9 pp. 113-119.
- Montville, T. J. y Winkowski, K (1997). Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. En: *Food Microbiology, fundamens and frontiers*. Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Montville, T. J. (Eds). ASM Press., Washington, D.C. pp. 557-577.
- Mora, Z. (1995). Estudio de las microfloras contaminantes durante la etapa de molienda de caña en relación con el proceso de elaboración de azúcar. Págs. 114. Tesis, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Programa Académico de Biología.

- Mullis K. y F. Faloona. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- Nam H. y Lee, Y. (2002) Effect of *Weissella confusa* Strain PL 9001 on the Adherence and Growth of *Helicobacter pilory*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 68 (9) pp- 4642-4646.
- Nascimento MDAS, Moreno I, Kuaye AY. (2008). Applicability of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as adjunct starter in Minas Frescal cheesemaking. *Int J Dairy Technol.*;61(4):352-7.
- Niven, C. F., Jr y Evans, J. B., (1957) *Lactobacillus viridescens* nov. spec., a heterofermentative species that produces a Green discolouration of cured meat pigments. *Journal of Bacteriology*. Vol.73, pp. 758-759
- NMX-F-735- COFOCALEC-2011. SISTEMA PRODUCTO-LECHE-ALIMENTOS-LÁCTEOS- ALIMENTO LÁCTEO REGIONAL- Queso COTIJA ARTESANAL MADURADO- DENOMINACIÓN, ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-243-SSA1-2010. Productos y Servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado, y derivados lácteos. Métodos de prueba.
- Nunez, M., Rodriguez, J. L., García, E., Gaya P., Medina M., (1997) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology* 83, 671-677.
- O'Leary WM. (1990). *Practical handbook of Microbiology*. 2 ed. Boca Ratón: CRC Press; pp. 581.
- Olvera M. (2013). Evaluación de la inocuidad de *Enterococcus* spp. aislados del queso Cotija. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. UNAM. México D.F.

- Patel JB., (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diag*; 6: 313-21.
- Peterson, S. D., Marshall, R. T. 1990. Nonstarter lactobacilli in cheddar cheese; a review. *J. Dairy Sci.* 73, 1395-1410.
- Raccach, M. (1987). Pediococci and biotechnology. *Crit Rev Microbiol* 14:291–309
- Rentería M. (2007). Breve Revisión de los Marcadores Moleculares. En *Ecología Molecular* (pp. 557-559). México, D.F.: IEPSA.
- Rivera, Q.J. (2004) . Evaluación del efecto bioconservador en salamis al adicionar *Pediococcus acidilactici* ATTC 8042 como cultivo iniciador. Tesis de Maestría en Microbiología FESC-UNAM.
- Robles, T. (2014). Identificación molecular de microorganismos aislados del Queso Cotija y sus materias primas. Tesis de Licenciatura. UNAM, México D.F.
- Rodicio, MR. y Mendoza, MC. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España;22(4):238-45
- Saiki R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis y H. A. Erlich. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91.
- Sais, H. & Sotolongo, R. (1976). Aislamiento de cepas cubanas de *L mesenteroides* y su comportamiento en la producción de dextrana técnica.
- Saitou N. y Nei M. (1987). The neighbor-joining method. A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Salminen S. Von Wright A. Ouwehand A. (2004). *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and functional aspects.* 3ª edición. Marcel Dekker inc. Estados Unidos. pp. 375-398.
- Salto I. (2013) Detección de *Staphylococcus aureus* en queso Cotija artesanal madurado. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. UNAM. México.

- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74(12): 5463-5467
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., (2002). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 93-105.
- Savadogo, A., Ouattara, C., Bassole, I. y Traore, A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria. *African Journal of Biotechnology*. 5, 678-683.
- Swofford D.L., G.J. Olsen, P.J. Waddell y D.M. Hillis. (1996). Phylogenetic inference. In: Hillis D.M., C. Moritz y B.K. Mabbe. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates Inc. Massachusetts. pp. 407-510
- Topisirovic, L. (2006). Potential of lactic bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*.
- Torres F. (2013). Detección de *Brucella spp.* mediante la técnica de pcr tiempo real en queso Cotija artesanal madurado. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. UNAM. México.
- Torres-Rodríguez I, Rodríguez-Alegría ME, Miranda-Molina A, Giles-Gómez M, Morales RC, López-Munguía A et al (2014) Screening and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Leuconostoc kimchii* isolated from traditional fermented pulque beverage. *SpringerPlus* 3:583
- Uroic´ K, Nikolic´ M, Kos B, Leboš Pavunc A, Beganovic´ J, Lukic´ J, Jovic´ B, Filipic´ B, Miljkovic´ M, Golic´ N, Topisirovic´ Lj, C´ adež N, Raspor P, Šuškovic´ J. (2014) Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Croatian fresh soft cheeses and Serbian white-pickled cheeses. *Food Technol Biotechnol* 52:232–241.
- Vandame, E. y De Vuyst, L. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, genetics and application. Chapman & Hall, Ltd. London.
- Vásques, M. S., Suárez M. H., Zapata B.S., 2009 Use of antimicrobial substances produced by acid lactic bacterias on meat conservation. *Revista Chilena de Nutrición* Vol. 36, No. 1. pp.64-71.

- Villani F and Coppola S (1994) Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 44:97–105
- Vinuesa Pablo. (2008). Conceptos básicos de evolución molecular y filogenética. Disponible en: http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/Cursos_PDFs/Tema1_aspectos_hist%C3%B3ricos_e_intro_evol_molec.pdf Consultado el 13 de Marzo del 2016 a las 10:59 pm.
- Vogel FV, Nyanga LK. (2005). Sourdough fermentation. In *Food fermentation*, Nout RMJ, de Vos WM, Zwietering MH (ed). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Weisburg, W., Barns S., Pelletier D. y Lane D. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697-703.
- Woolford, M. K. (1975) Microbiological screening of food preservatives, cold and sterilants and specific antimicrobial agents as potencial silage additives. *J. sci. Food. Agriculture.* 26. 229-232.
- Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glockner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Mora R. (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and Archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev. Microbiol*; 12 (9): 635-45.
- Zaib-Un-Nisa, Salim-Ur-Rehman, Huma, N., Shahid, M. (2016). Impact of mixed lactic acid bacterial (LAB) culture on flavoring profile and quality attributes of spring wheat sourdoughbread. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences.* 53: 225-231.

