



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Identificación molecular de la comunidad bacteriana del queso bola de Ocosingo mediante PCR-DGGE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.A. Linares Arévalo Novia Minerva

TUTOR PRINCIPAL

Maricarmen Quirasco Baruch
[Facultad de Química UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Daniel de los Cobos Vasconcelos
[Instituto de Ingeniería UNAM](#)

Francisco Ruiz Terán
[Facultad de Química UNAM](#)

Ciudad de México. Abril, 2022



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.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio 312 del conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch.

El comité tutor estuvo integrado por:

Dr. Daniel de los Cobos Vasconcelos Instituto de Ingeniería, UNAM.

Dr. Francisco Ruiz Terán Facultad de Química, UNAM.

Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM IN229319: “Análisis de la microbiota bacteriana del queso bola de Ocosingo: descripción polifásica y potencial biotecnológico” y por el PAIP FQ con la clave 5000-9102. Se agradece a CONACyT por la beca de Maestría y al Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado-UNAM por el apoyo para la asistencia a congreso; así como a PAPIIT-DGAPA-UNAM IN229319 por la beca para la obtención de Grado.

Jurado de examen:

PRESIDENTE Romina Rodríguez Sanoja

VOCAL Bertha González Pedrajo

VOCAL Laura Camarena Mejía

VOCAL María Amanda Gálvez Mariscal

SECRETARIO José Adelfo Escalante Lozada

ÍNDICE

Resumen.....	5
1. Marco teórico.....	7
1.1. Queso	7
1.1.1. Comunidad microbiana en queso	8
1.2. Quesos artesanales	9
1.3. Queso bola de Ocosingo	11
1.4. Estudio de la comunidad microbiana en queso	16
1.4.1. Métodos dependientes de cultivo	16
1.4.2. Métodos independientes de cultivo	17
❖ ADNr 16S	23
❖ rpoB	25
2. Antecedentes	26
3. Justificación.....	29
4. Hipótesis	29
5. Objetivos	30
5.1. Objetivo general	30
5.2. Objetivos particulares	30
6. Diagrama experimental.....	31
7. Metodología.....	32
7.1. Descripción de las muestras	32
7.2. Recuperación del paquete celular microbiano a partir del queso	33
7.3. Extracción y purificación de ADN	33
7.4. Amplificación del fragmento del gen 16S ADNr y del gen rpoB	34
7.5. DGGE perpendicular	36
7.6. Tinción SYBR Green vs plata	36
7.7. DGGE paralelo	37
7.8. Análisis del perfil de bandeo en DGGE paralelo	37
7.9. Recuperación y reamplificación de ADN extraído de bandas individuales ..	38
7.10. Clonación	39
7.11. Purificación de productos de PCR y secuenciación	40
7.12. Análisis para la identificación de bacterias	41
7.13. Análisis filogenético	41

8.	Resultados y discusión.....	43
8.1.	Establecimiento de las condiciones de extracción de ADN de los microorganismos del queso.....	43
8.2.	PCR cebadores con grapa	43
8.3.	DGGE perpendicular.....	44
8.4.	Extracción ADN microorganismos de queso bola chica y bola grande	47
8.5.	PCR cebadores con grapa	48
8.6.	DGGE paralelo y comparación entre las tinciones SYBR green y plata	50
8.7.	DGGE paralelo y análisis del perfil de bandeo.....	52
8.8.	Recuperación y reamplificación de ADN extraído de bandas individuales..	60
8.9.	Clonación	61
8.10.	Identificación de bacterias dominantes	63
8.11.	Géneros encontrados en queso bola de Ocosingo	81
8.12.	Análisis de bacterias dominantes en queso bola de Ocosingo	87
9.	Conclusiones.....	93
10.	Perspectivas.....	94
11.	Referencias	95
12.	Anexo	108

Resumen

El queso bola de Ocosingo es un producto artesanal madurado, elaborado en el municipio de Ocosingo en Chiapas, a partir de leche cruda de vaca y ausencia de un cultivo iniciador. Al igual que otros quesos artesanales, al no utilizar leche pasteurizada para su elaboración, se duda de la inocuidad del producto final y es por eso que resulta importante conocer la gama de bacterias presentes en este queso.

Esta investigación se enfocó en la identificación de la población bacteriana dominante en el queso bola de Ocosingo mediante la técnica independiente de cultivo PCR-DGGE. Para tener un panorama más completo sobre la comunidad bacteriana presente se utilizaron cuatro diferentes pares de cebadores, tres de ellos amplifican regiones variables distintas del ADNr 16S y el cuarto amplifica una región del gen *rpoB*.

Los patrones de bandeo obtenidos en DGGE paralelo fueron diferentes para los cuatro pares de cebadores utilizados; en cada uno se calcularon valores de intensidad relativa promedio para identificar a las OTUs dominantes y se secuenciaron para conocer su identidad.

Con los cebadores que amplifican la región V4-V7 y V7-V8 del ADNr 16S únicamente se logró identificar a bacterias del género *Streptococcus* como dominantes; con los cebadores que amplifican la región V3 del ADNr 16S se logró identificar a bacterias del género *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia* y las especies *Acinetobacter lwoffii* y *Klebsiella pneumoniae*, como dominantes; y con los cebadores que amplifican una región del gen *rpoB* se identificaron como dominantes a las bacterias *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* y *Lactococcus garvieae*, y como no dominantes a *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Escherichia coli*, con este último gen fue posible llevar la identificación hasta el nivel de especie.

Este estudio demuestra la importancia de la selección de genes y regiones a amplificar. Se sugiere para el queso bola utilizar al menos dos pares de cebadores

diferentes para el análisis de las comunidades bacterianas, el que amplifica la región V3 del ADNr 16S y el que amplifica una región del gen *rpoB*, ya que con ambos pares se obtiene información complementaria.

1. Marco teórico

1.1. Queso

El queso es uno de los productos alimenticios más antiguos, se ha producido y consumido durante miles de años y se ha adaptado a las condiciones técnicas, sociales y económicas en varias partes del mundo. Además, los procesos tecnológicos asociados con el entorno de fabricación dan forma a la química y la microbiología de los quesos, que posteriormente desarrollan las características visuales, de olor, sabor y textura, sobre todo en los quesos madurados (Dugat-Bony *et al.*, 2016). El queso es uno de los alimentos más complejos, fascinantes y diversos que se disfrutan hoy en día por lo que resulta muy difícil dar una definición que contemple todos los productos incluidos en el grupo general de quesos debido al gran número de tipos y variedades, así como las formas de elaboración que existen en el mundo.

Eck (2000) define al queso como el producto obtenido por coagulación de la leche cruda o pasteurizada (entera, semidescremada o descremada), constituido esencialmente por caseína de la leche en forma de gel, más o menos deshidratado.

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba, el queso se define como aquellos productos elaborados de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior, por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado.

La misma norma define a los quesos frescos como aquellos que se caracterizan por su alto contenido de humedad, y por no tener corteza o tener corteza muy fina, pudiendo o no adicionarles aditivos e ingredientes opcionales; define a los quesos

madurados como aquellos que se caracterizan por ser de pasta dura, semidura o blanda y pueden o no tener corteza, sometidos a un proceso de maduración bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, lo que le permite prolongar su vida de anaquel; y define a los quesos procesados como aquellos que se caracterizan por ser elaborados con mezclas de quesos, fusión y emulsión con sales fundentes, aditivos para alimentos permitidos e ingredientes opcionales, sometidos a proceso térmico de 70°C durante 30 segundos o someterse a cualquier otra combinación equivalente o mayor de tiempo y temperatura.

Cuatro ingredientes básicos son requeridos para la elaboración de la mayoría de los quesos: leche, cuajo, sal y microorganismos (opcional) (Fox *et al.*, 2000). Estos cuatro ingredientes generalmente son procesados mediante diferentes pasos como son la coagulación, desuerado, salado y, en algunos de ellos, la maduración. Mediante estos procesos se logra preservar el valor nutritivo de la mayoría de los componentes de la leche, incluidas las grasas, proteínas y otros constituyentes menores, generando un sabor especial y una consistencia sólida o semisólida en el producto obtenido (Ramírez-López & Vélez-Ruíz, 2014).

1.1.1. Comunidad microbiana en queso

Los microorganismos son un componente esencial de muchas variedades de queso así que juegan un papel importante durante la elaboración y maduración. La composición y actividad de la microbiota en los quesos es el parámetro menos controlable. Según sus funciones la microbiota de los quesos en general se puede dividir en 2 grupos: bacterias ácido lácticas iniciadoras (SBAL) y microbiota secundaria (Beresford *et al.*, 2001).

- ❖ SBAL: Utilizan la lactosa como fuente de carbono resultando en la producción de ácido láctico lo que ayuda a la formación de cuajada y evita el crecimiento de ciertos microorganismos. Dentro de las BAL iniciadoras se encuentran: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* sp.

cremoris, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii*.

- ❖ Microbiota secundaria: Mezclas de levaduras, hongos y bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSBAL), dominan la microbiota de queso durante la maduración contribuyendo al desarrollo de las características finales del queso. En este grupo se encuentran: *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium freundenreichii*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti* (Blaya *et al.*, 2018; Settanni & Moschetti, 2010).

La comunidad microbiana del queso se origina a partir de cultivos iniciadores, leche cruda (especialmente en quesos tradicionales o no pasteurizados), cultivos complementarios y microorganismos adventicios que se inoculan a partir del equipo y el entorno del lugar de fabricación (Afshari *et al.*, 2018).

Los defensores de quesos artesanales recomiendan mantener una alta diversidad taxonómica en las comunidades microbianas de los quesos; sus argumentos se basan en el hecho de que una gran diversidad de actividades microbianas combinadas con métodos particulares de fabricación son las claves para permitir que los quesos artesanales desarrollen sus características particulares, incluido el bajo riesgo de presencia de patógenos contribuyendo a la seguridad para el consumo humano y la diversificación de las características sensoriales (Montel *et al.*, 2014; Escobar-Zepeda *et al.*, 2016).

1.2. Quesos artesanales

Actualmente, la fabricación de queso es una de las industrias más importantes en México, para el año 2019 se estimó una producción de 476 mil 927 toneladas de queso con un valor en el mercado de 25 mil 553 millones de pesos (SIAP, 2020). La industria quesera utiliza aproximadamente el 25% del total de leche producida en el país. Se cree que al menos un porcentaje similar de leche es utilizado por los

queseros artesanales o de pequeña escala para la producción de queso, que no se cuantifica oficialmente. La importancia de esta industria se refleja en la estimación de que alrededor del 70% de todo el queso mexicano proviene de producciones de pequeña escala. En México, se reconocen hasta la fecha casi 40 variedades diferentes de quesos (González-Córdova *et al.*, 2016).

La mayor parte de los quesos artesanales, en la actualidad, son elaborados por industrias micro, pequeñas o medianas, muchas veces ubicadas en rancherías y pequeños pueblos empleando métodos rústicos, no tiene patrones establecidos de elaboración, no están estandarizados ni pueden usarse como referencia o prototipo de los quesos de su especie para producirse de manera independiente. Generalmente carecen de un control de calidad estricto, en la mayoría de los casos son elaborados a partir de leche cruda, sin pasteurizar y, a veces, los proveedores de leche para estas queserías pertenecen a la ganadería familiar. Por lo anterior, es frecuente que muestren una limitada conservación, salvo en el caso de los quesos madurados, y suelen ser objeto de señalamientos por su presunta falta de inocuidad. Así, la variabilidad en los productos y en los procesos de elaboración es la regla. (Villegas & Cervantes, 2017).

En la comunidad microbiana presente en la leche cruda se encuentran bacterias ácido lácticas (BAL) (*Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., y *Enterococcus* spp., entre otras), pero microorganismos como los de la familia *Enterobacteriaceae*, coliformes, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. o *Listeria monocytogenes* pueden también estar presentes y esto aumenta el potencial de riesgo para la salud (Gonçalves *et al.*, 2018).

Los quesos artesanales no cumplen con la normativa mexicana que establece que toda la leche utilizada para la producción de queso en el territorio nacional debe someterse a la pasteurización (NOM-243-SSA1-2010). Sin embargo, la pasteurización eliminaría parte de la microbiota nativa de la leche cruda, lo que afectaría las características sensoriales del queso, como el sabor, olor y calidad de la textura (Albenzio *et al.*, 2001).

El hecho de que los estudios científicos sobre quesos artesanales mexicanos son escasos, la falta de estandarización en los procesos de fabricación y la deficiente capacidad de organización de los productores de queso han llevado a la falta de estándares específicos definidos. Por todas estas razones, los quesos artesanales mexicanos no han sido incluidos dentro del sistema de clasificación DOP (Protección Denominación de Origen). Sin embargo, el panorama ha comenzado a cambiar, ya que algunas organizaciones especializadas en quesos artesanales, con el apoyo de centros de investigación y universidades mexicanas, han obtenido una Marca Colectiva para los quesos Cotija, Bola de Ocosingo, Poro de Balancán y Crema de Chiapas. La distinción de una Marca Colectiva representa una protección oficial y una ventaja competitiva para los productores de estos quesos, de modo que los consumidores pueden diferenciar entre el queso artesanal genuino y sus imitaciones. Además, la Marca Colectiva sirve para garantizar la calidad del producto y un precio justo para los queseros. Esto demuestra la necesidad de grupos de expertos que apoyen a las organizaciones de queseros para que se unan y lleven a cabo estudios sobre las diferentes variedades de quesos artesanales mexicanos con el objetivo de obtener información que pueda ayudar a proteger y regular su producción de acuerdo con las regulaciones mexicanas sobre seguridad alimenticia. Esto ofrecería protección a los quesos tradicionales mexicanos para que no pierdan su carácter artesanal y garanticen la calidad y seguridad del producto (González-Córdova *et al.*, 2016).

1.3. Queso bola de Ocosingo

El queso bola se elabora en Ocosingo, el municipio más grande del estado de Chiapas. Limita al Norte con Palenque, al Este y al Sur con la República de Guatemala, al Suroeste con Las Margaritas y al Noroeste con Chilón, Oxchuc, Altamirano y San Juan Cancuc (Figura 1). Este municipio se localiza al este del estado, en las Montañas del Oriente o Lacandonia, por lo que la mayor parte de su territorio es montañoso.

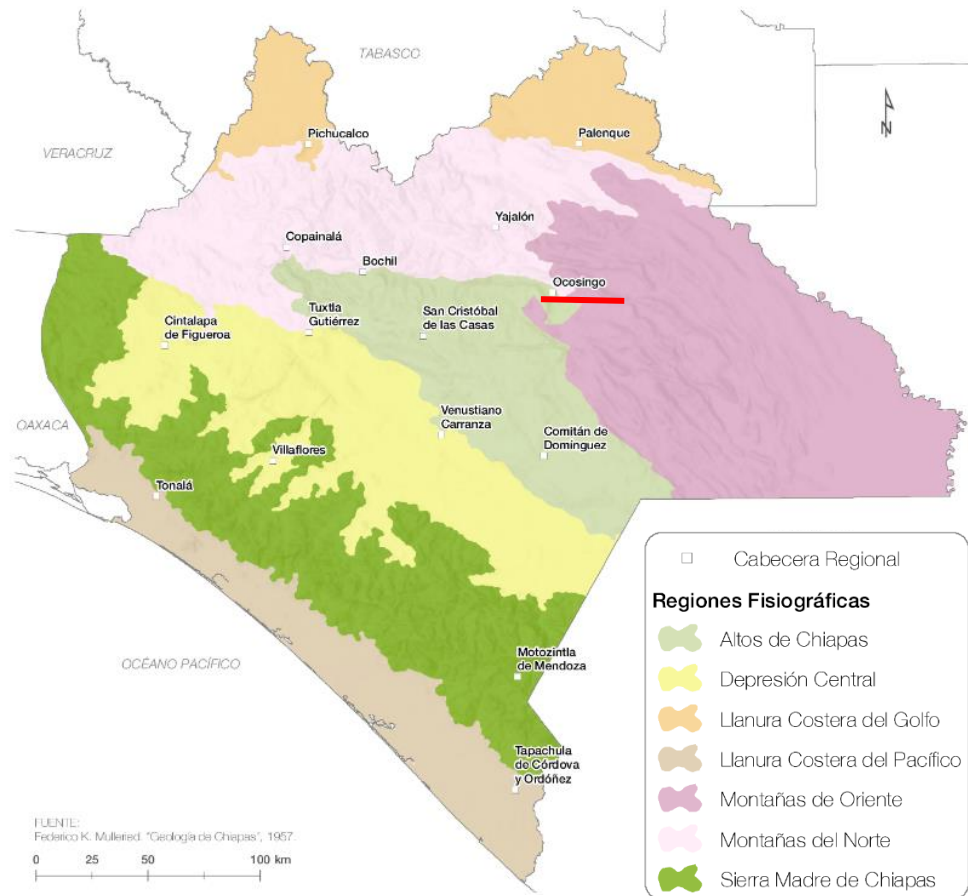


Figura 1. Localización del municipio de Ocosingo, Chiapas (CEIEG, 2019).

El clima del municipio varía con la altitud, predominando el cálido húmedo, mientras que la temperatura media anual se sitúa entre 18 y 28 °C (INAFED, Cervantes *et al.*, 2014).

El queso se elabora con leche cruda de vaca de doble propósito (este tipo de ganado se utiliza para la producción y venta tanto de leche como de carne) proveniente exclusivamente de ganado de la región, cruza de cebú y pardo suizo que pastorea libremente (López *et al.*, 2015).

El queso es una bola dura, con diámetro de entre 8 y 12 centímetros, y un peso aproximado entre 400 gramos y 1 kilogramo. Se trata de un producto inusual

comparado con otros quesos artesanales mexicanos debido a que está formado por dos quesos, uno dentro del otro: el núcleo, constituido por una pasta fermentada y madurada varios días a temperatura ambiente tropical. La otra parte es el forro del núcleo, estructura derivada de una cuajada de pasta hilada elaborada con leche completamente descremada, la cual se deshidrata en varias horas y se convierte en un material duro de protección, a la manera de un empaque rústico (Figura 2). La mayor parte del porcentaje del peso de este producto corresponde al núcleo (cerca de 80%). Su proceso de producción es peculiar y ha sido transmitido de generación en generación (González-Córdova *et al.*, 2016; Villegas & Cervantes, 2017).

Cabe señalar que ya cuenta con la Marca Colectiva que refuerza su valor agregado. El 24 de octubre del 2005, el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) otorgó a la Sociedad Agropecuaria e Industrial Quesera de Ocosingo S.P.R. de R.I. (SAIQUO) el registro de la marca: “Queso bola de Ocosingo, Chiapas” (López *et al.*, 2015).

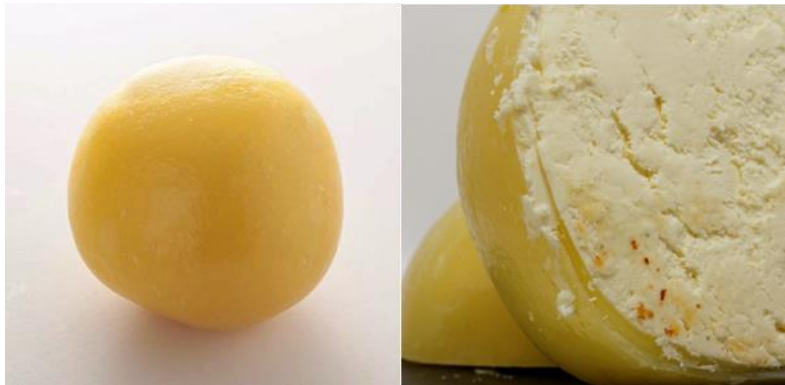


Figura 2. Queso bola de Ocosingo, Chiapas (Modificado de González-Córdova *et al.*, 2016).

El proceso general de elaboración de este queso se encuentra en la Figura 3 y se explica con detalle a continuación:

- 1) **Recepción.** La leche cruda se recibe por la mañana y se coloca en un tambo.
- 2) **Cuajado y reposado.** Previamente a la adición de cuajo a la leche, se le agrega crema, obtenida de otro lote de leche que se descrema, y que servirá para elaborar las cubiertas del núcleo. Se le agrega una dosis de cuajo líquido y se deja reposar durante 24 horas aproximadamente.
- 3) **Levantado y manteado.** Al otro día, se coloca la cuajada en una bolsa o manta de algodón.
- 4) **Salado y escurrido.** Una vez en la manta, se deja escurrir durante unas horas. Después de 3 a 4 horas de escurrido, se sala la cuajada y se cambia la manta.
- 5) **Madurado de la pasta.** La masa se deja reposar a temperatura ambiente para que madure en un lapso de varios días, cambiando la manta cada tercer día. Durante cada cambio de manta, se vuelve a amasar la pasta. El queso bola de Ocosingo, según lo declaran las Reglas de Uso de la Marca Colectiva territorial, propiedad de los queseros organizados, debe madurar 21 días al ambiente (SAIQUO, 2004). La fermentación y maduración se efectúa por la microbiota nativa de la leche, además de lo que se pueda inocular a través de los materiales utilizados, de las superficies de elaboración y por parte de los mismos productores.
- 6) **Moldeado.** Se forman porciones de unos 400 g o 1 Kg. Con las manos se compactan y se les imparte una forma casi esférica. Finalmente, las piezas se forran con dos capas sucesivas de cuajada hilada y caliente, elaborada con leche descremada. Este material, rico en caseína, al enfriarse y orearse se endurece. Del queso bola de Ocosingo se puede consumir tanto el núcleo como la corteza (Modificado de Cervantes *et al.*, 2014).

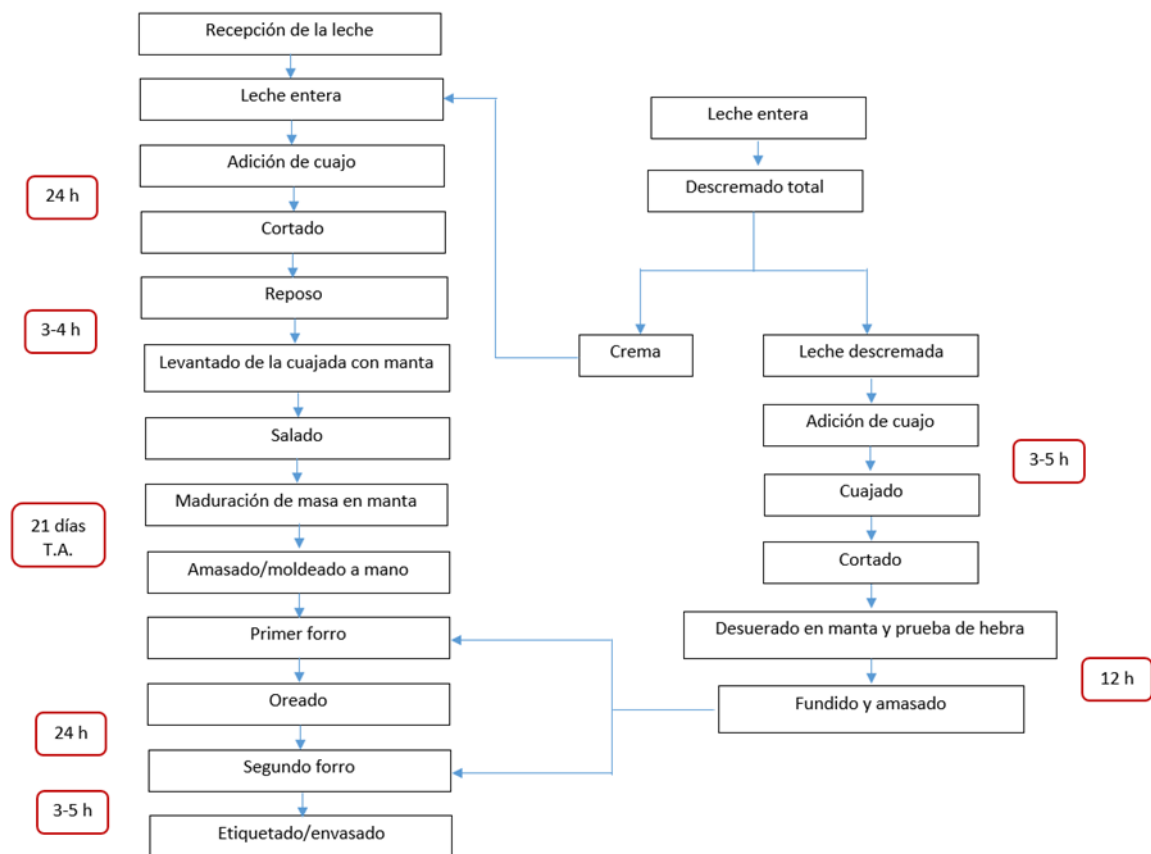


Figura 3. Diagrama de elaboración del queso bola de Ocosingo, Chiapas. (Tomado y modificado de Villegas & Cervantes, 2017).

El nivel tecnológico de las queserías corresponde al perfil artesanal con equipamiento básico, algunas tienen implementos de acero inoxidable, y en otras persiste el uso de utensilios de madera (Agudelo & Cesín, 2013). Su producción se ha dado en espacios rurales aislados y bajo condiciones de rezago tecnológico, lo que evita su producción masiva en el contexto del mercado global.

Diversos estudios se han realizado con el objetivo de rescatar la producción artesanal de quesos y darla a conocer a la población mexicana. En este sentido, generar información en torno a la quesería artesanal que permita caracterizarla y que conduzca a su reconocimiento y valorización en los territorios, constituye un aporte a la generación de conocimiento (Agudelo *et al.*, 2016).

1.4. Estudio de la comunidad microbiana en queso

Las comunidades microbianas a menudo son difíciles de manipular experimentalmente debido a la alta diversidad de especies, la baja capacidad de cultivo y la incapacidad de simular fácilmente su ambiente natural (Wolfe *et al.*, 2014). Recientemente, en la microbiología de alimentos se ha visto la necesidad de tomar en cuenta el ecosistema completo que se desea analizar, ya que el crecimiento, la sobrevivencia y la actividad de cualquier especie, pueden estar determinados por la presencia de otras especies. Los alimentos fermentados contienen generalmente una microbiota compleja, que es difícil de describir y de estudiar experimentalmente.

El conocimiento de la estructura y dinámica de toda la comunidad microbiana del queso podría promover el mejor entendimiento de como varían las características del queso con respecto al crecimiento microbiano y el metabolismo. Por ejemplo, un mejor control sobre la composición de la microbiota podría hacer posible una mejor selección de propiedades específicas organolépticas o para prevenir defectos de calidad (Díaz & Wachter, 2003).

La comunidad bacteriana y fúngica de los quesos han sido parcialmente identificadas usando métodos tradicionales (dependientes de cultivo) y recientemente con el uso de técnicas moleculares (independientes de cultivo).

1.4.1. Métodos dependientes de cultivo

Mediante el uso de los métodos clásicos, se realizan recuentos de microorganismos y se determina su diversidad en medios sintéticos con agar, pero en algunos casos se requiere un período de incubación en medio líquido para promover el crecimiento de microorganismos específicos o seleccionarlos, ya que su aislamiento sería imposible sin este paso, posteriormente se hace su identificación de acuerdo a sus características morfológicas, genéticas o bioquímicas, pero estas características no

son siempre reproducibles debido a que el metabolismo depende de las condiciones de cultivo.

Además, algunos microorganismos no pueden crecer en el medio de cultivo debido a la falta de nutrientes específicos o incluso, encontrarse en el discutido estado “viables pero no cultivables”; por esta razón la población numéricamente menos importante, o en condiciones de estrés, apenas es recuperada e identificada. En general, los métodos dependientes de cultivo son menos costosos comparados con los moleculares, sin embargo, consumen mayor tiempo debido a los periodos de incubación. El gran inconveniente con estos métodos es la imposibilidad de llegar a tener una visión precisa de la biodiversidad de sistemas complejos, poseen una baja resolución taxonómica ya que sólo es posible identificar en la mayoría de los casos hasta género, limitando mucho el estudio y no serían prácticos para monitorear la dinámica bacteriana durante la elaboración de queso y su maduración. Con los métodos dependientes de cultivo lo que se recolecte en el medio no será representativo de la comunidad y la diversidad microbiana será malinterpretada (Díaz & Wachter, 2003; Hugenholtz *et al.*, 1998).

1.4.2. Métodos independientes de cultivo

Hace 30 años el crecimiento de microorganismos en medio sintético era la única forma de realizar investigación microbiológica en alimentos. Después del desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ha sido posible desarrollar varias técnicas moleculares para identificar microorganismos evitando el cultivo (Garofalo *et al.*, 2017).

Los métodos independientes de cultivo son capaces de detectar e identificar microorganismos directamente en el sistema sin cultivarlos ni aislarlos, ya que analizan su ADN o ARN. Su novedad se basa en la extracción de los ácidos nucleicos de las muestras de interés, los cuales posteriormente son analizados por métodos que finalmente permiten obtener la identificación de la diversidad microbiana. Como son más rápidos, estos métodos son adecuados para el análisis

de comunidades microbianas a través del tiempo y puede ayudar a explorar la dinámica de la microbiota en detalle. Muchos de estos métodos independientes de cultivo se basan en el principio de la PCR que permite la amplificación selectiva de fragmentos de ADN específicamente dirigidos mediante el uso de cebadores universales para bacterias; por ejemplo, los amplicones obtenidos en la PCR de diferentes especies se pueden discriminar usando electroforesis en geles desnaturizantes para su tamizaje o mediante hibridación con sondas específicas (Figura 4).

Con el uso de estos métodos pueden surgir problemas técnicos: algunos genomas pueden permanecer sin ser detectados debido a la baja abundancia de especies en el sistema, la baja disponibilidad de especies debido a una homogeneización insuficiente de la matriz, una lisis celular inadecuada que impide la liberación de ácidos nucleicos, una amplificación preferencial o la inhibición de la amplificación por PCR (Jany & Barbier, 2008; Temmerman *et al*; 2004).

Los protocolos existentes para la extracción de ADN a partir de muestras provenientes de queso incluyen la homogeneización mecánica en soluciones salinas; la lisis celular se puede hacer con detergentes o enzimas tales como proteinasa K. La lisis se puede mejorar mecánicamente, sacudiendo vigorosamente las muestras en tubos que contienen perlas de vidrio.

Estudiando el ADN, es posible definir cuáles son las especies microbianas presentes en una muestra específica. Uno de los métodos independientes de cultivo más populares y más a menudo utilizado por los investigadores es la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), junto con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Jany & Barbier).

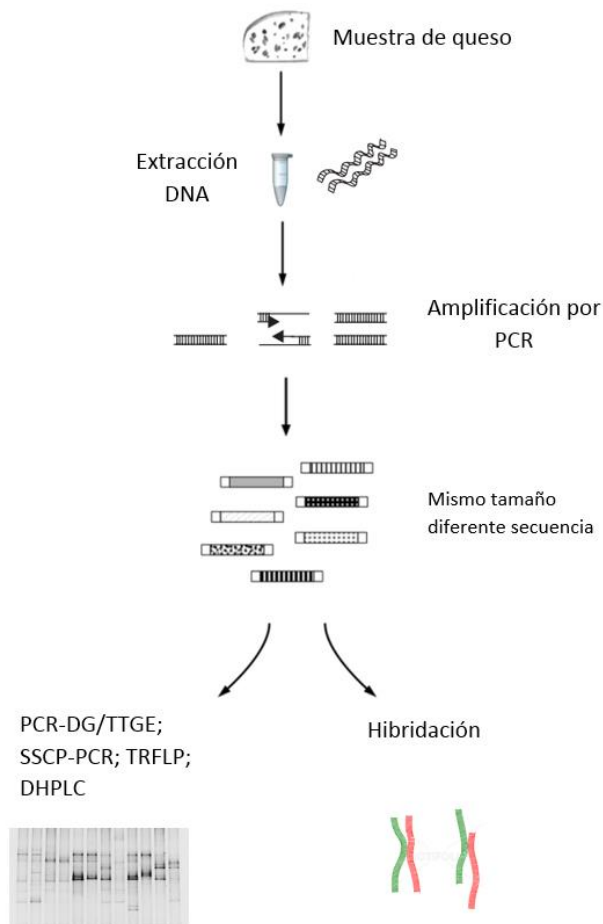


Figura 4. Aplicación de métodos independientes de cultivo basado en ADN (Tomado y modificado de Jany & Barbier, 2008). DGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante, TGGE: electroforesis en gel con gradiente de temperatura, SSCP: polimorfismo de conformación de cadena sencilla, TRFLP: polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción terminal, DHPLC: cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento.

❖ PCR-DGGE

PCR-DGGE es una técnica que utiliza un gradiente químico de agentes desnaturalizantes en un gel de acrilamida para separar una mezcla de fragmentos de ADN pequeños (alrededor de 200-700 pb) amplificados por PCR, de la misma longitud pero con diferentes secuencias.

Los fragmentos de ADN provenientes de una mezcla de microorganismos se desnaturalizan parcialmente dependiendo de su contenido de GC a medida que pasan a través del gradiente creando moléculas ramificadas, esta ramificación reduce la movilidad del ADN en el gel. Las moléculas desnaturalizadas se retrasan en el punto de desnaturalización debido a la estructura secundaria recién adquirida, logrando así la separación de las moléculas, por lo que los fragmentos correspondientes a microorganismos diferentes tendrán distintas posiciones en el gel. Los estudios de DGGE normalmente emplean cebadores de PCR en los que una “cola” rica en GC de aproximadamente 40 nucleótidos llamada grapa, se agrega en uno de los cebadores, esto da como resultado una estructura parcialmente desnaturalizada en la que la grapa GC permanece bicatenaria (Miragoli *et al.*, 2020; Strathdee & Free, 2013).

La ventaja de este método es que bandas individuales de interés pueden ser cortadas del gel e identificadas vía secuenciación. Sin embargo, la amplificación de diferentes microorganismos con una movilidad electroforética similar puede resultar en una baja calidad de la secuencia del ADN. La clonación del ADN de las bandas cortadas resulta en secuencias más claras comparadas con una secuenciación directa, pero es significativamente más laborioso (Nocker *et al.*, 2007).

Un punto importante es determinar cuál es el gen a amplificar, esto es, el que nos va a permitir discriminar las secuencias de los microorganismos presentes. Esta técnica se aplica comúnmente a los análisis que utilizan fragmentos del ADNr 16S que está universalmente conservado y tiene regiones altamente conservadas separadas por regiones de variación de secuencia (Strathdee & Free, 2013).

Desde su introducción en la ecología microbiana a principios de la década de 1990, la PCR-DGGE se ha convertido en uno de los métodos moleculares más explotados para la investigación de la diversidad bacteriana de los ecosistemas alimentarios, incluidos quesos (Aquilanti *et al.*, 2016). La Tabla 1 muestra algunos estudios que utilizaron esta técnica, el fragmento de ADNr 16S utilizado y las bacterias encontradas.

Tabla 1. Estudios que utilizan la técnica PCR-DGGE para evaluar la ecología bacteriana en quesos.

Muestra	Especies microbianas identificadas	Región/Gen	Referencia
Queso de vena azul (Reino Unido)	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Staphylococcus equorum</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Brevibacterium</i> sp.	V3 / 16S	Yunita & Dodd, 2018
	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Staphylococcus equorum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Halomonas</i> sp.	V4-V5 / 16S	
	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Alkalibacterium</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp.	V6-V8 /16S	
Queso Taleggio (Italia)	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Arthrobacter nicotianae</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Facklamia</i> sp., <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> sp., <i>Psychrobacter aquimaris</i> , <i>Psychrobacter</i> sp., <i>Staphylococcus equorum</i> , <i>Staphylococcus simulans</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Streptococcus viridans</i> ,	V3 /16S	Feligini <i>et al.</i> , 2012
Queso Caciotta (Italia)	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> .	V3 / 16S	Pisiano <i>et al.</i> , 2020
Queso tipo Camembert (China)	<i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>Acetobacter lovaniensis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> .	V3 /16S	Mei <i>et al.</i> , 2014
Queso Danbo (Dinamarca)	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Staphylococcus equorum</i> , <i>Bavariicoccus seileri/alcaligenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Agrococcus casei</i> , <i>Corynebacterium variabile</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> sp.	V3 /16S	Ryssel <i>et al.</i> , 2015
Queso Tulum Izmir (Turquía)	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> , <i>Lactobacillus gallinarum</i> , <i>Streptococcus equinus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> ,	V3 /16S	Karabey <i>et al.</i> , 2018

	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactococcus garvieae</i>		
Queso Havarti y Danbo (Italia)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus oligofermentans</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Staphylococcus equorum</i> , <i>Vagococcus carniphilus</i> , <i>Bavariicoccus seileri</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Psychrobacter</i> sp., <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i> , <i>Corynebacterium variable</i> , <i>Corynebacterium casei</i> , <i>Brachybacterium</i> sp., <i>Brevibacterium linens</i> .	V3 / 16S	Gori et al., 2013
Queso Ragusano (Italia)	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Enterococcus hirae</i> .	V6-V8 / 16S	Randazzo et al., 2002
Queso Castelmagno (Italia)	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>Enterococcus</i> sp. <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> .	V1 / 16S	Dolci et al., 2008

(A partir de 2020, *Lactobacillus casei/paracasei* se reclasificó como *Lacticaseibacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus plantarum* se reclasificó como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* se reclasificó como *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus oligofermentans* se reclasificó como *Paucilactobacillus oligofermentans*, *Lactobacillus curvatus* se reclasificó como *Latilactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum* se reclasificó como *Limosilactobacillus fermentum* (Zheng et al., 2020). A partir del 2016, *Arthrobacter nicotianae* se reclasificó como *Glutamicibacter nicotianae* (Busse, 2016)).

Como se observa en la Tabla 1, en muestras de queso todos los estudios de comunidades bacterianas mediante DGGE se basan en el análisis del ADNr 16S y la región hipervariable V3 es el blanco que más se ha utilizado, ninguna región única puede diferenciar entre todas las bacterias y se pueden usar diferentes regiones según el objetivo, por lo que el uso de diferentes conjuntos de cebadores dirigidos a diferentes regiones puede mejorar el análisis (Jany & Barbier, 2008).

❖ ADNr 16S

El uso de los genes de ADN ribosómico ha sido el estándar de oro para la investigación taxonómica molecular durante décadas. El gen de la subunidad ribosómica menor 16S (ADNr 16S), en particular, se ha utilizado ampliamente para estudiar y caracterizar las composiciones de la comunidad bacteriana en una variedad de nichos (Mizrahi-Man *et al.*, 2013).

En los procariotas, los genes del ADNr 16S son esenciales y se encuentran en al menos una copia en un genoma (Wang & Qian, 2009). El producto de este gen es un ARNr de aproximadamente 1500 nucleótidos y como cualquier secuencia nucleotídica de cadena sencilla, se pliega y adquiere una estructura secundaria que se caracteriza por tener segmentos de doble cadena que permiten la formación de tallos y bucles (Figura 8) (Valenzuela-González *et al.*, 2015). Las secuencias de algunos de los bucles son conservadas en casi todas las especies bacterianas debido a las funciones esenciales involucradas, mientras que las características de las partes estructurales son en gran medida variables y específicas de una o más clases (Wang & Qian, 2009).

El ARNr 16S contiene nueve regiones hipervariables (V1-V9) que son las que aportan la mayor información útil para estudios de filogenética y taxonomía. Las regiones conservadas son de gran ayuda para diseñar iniciadores universales que permitan la amplificación de las diversas regiones hipervariables (Valenzuela-González *et al.*, 2015).

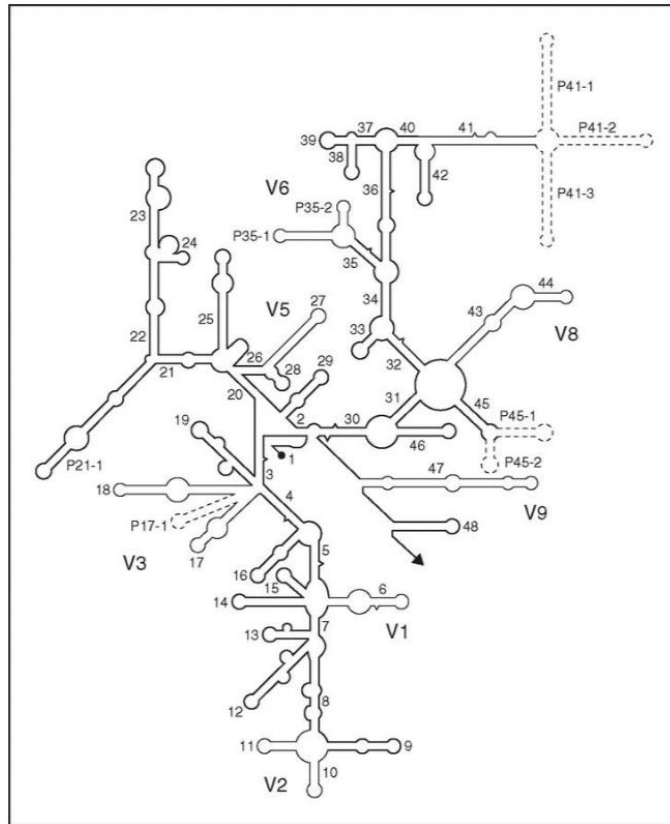


Figura 8. Estructura secundaria del ARN ribosomal 16S (Rodicio & Mendoza, 2004).

El uso de regiones específicas del ADNr 16S y PCR-DGGE ha sido frecuentemente combinado con secuenciación para una subsecuente identificación de las especies presentes en una muestra. Se ha observado heterogeneidad en la secuencia del ADNr 16S en genomas bacterianos, por lo que varias bandas provenientes de la misma especie serán vistas en un análisis de PCR-DGGE. La heterogeneidad intraespecie es el resultado de la presencia de múltiples copias del gen ribosomal y del hecho de que las copias del gen han evolucionado de manera diferente. Una solución a este problema es el análisis de algún gen que exista en una sola copia como lo es *rpoB* (Dahllöf *et al.*, 2000).

❖ *rpoB*

La ARN polimerasa es una enzima crucial en el proceso de transcripción. En bacterias, esta enzima es responsable de transcribir las regiones codificantes para ARNm, ARNr y ARNt; su núcleo consta de cinco subunidades: un dímero α , una subunidad β , una subunidad β' y una subunidad ω ; estas subunidades forman una holoenzima al unirse a una subunidad α que inicia la transcripción (Figura 9). La función catalítica es llevada a cabo por las subunidades β' y β , esta última es codificada por el gen *rpoB* y está altamente conservada en bacterias; sin embargo, existen muchas inserciones específicas de especie (Murakami, 2015) por lo que el gen *rpoB* es un candidato para la identificación de bacterias y junto con el gen ADNr 16S ha ayudado a perfeccionar el análisis de las comunidades bacterianas. (Adékambi *et al.*, 2009). Contrario a las copias múltiples del gen 16S ADNr, *rpoB* es un gen de copia única que elimina variaciones en la secuencia en un solo organismo (Bondoso *et al.*, 2013). Este gen no ha sido utilizado para la identificación de bacterias en muestras de queso mediante DGGE.

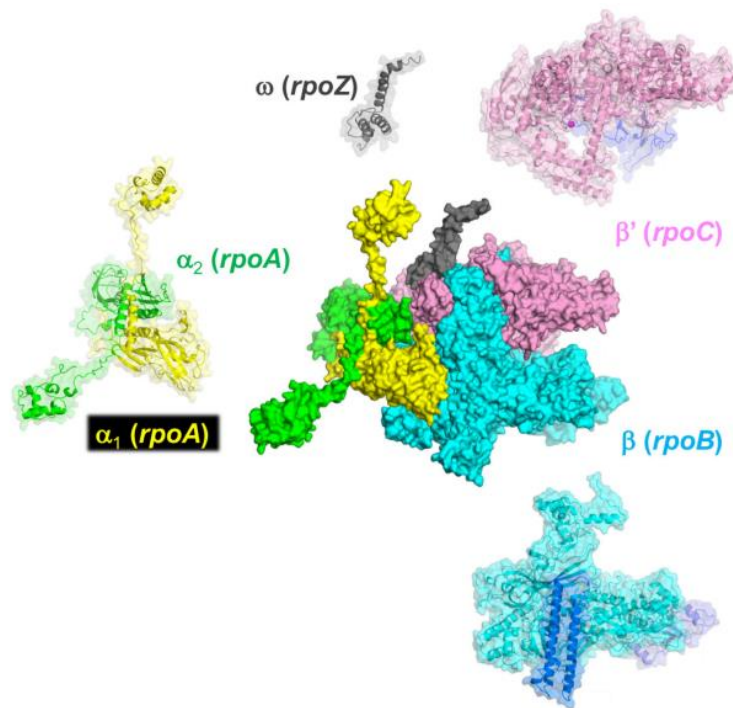


Figura 9. Esquema de la ARN Polimerasa de *E. coli*, α_1 : amarillo, α_2 : verde, β : cian, β' : rosa, y ω : gris (Sutherland and Murakami, 2018).

2. Antecedentes

En el año 2016 Grajales Herrera en la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, realizó el aislamiento de BAL a partir de queso bola de Ocosingo. El aislamiento de bacterias se llevó en medio MRS y las colonias aisladas se identificaron por secuenciación del ADNr 16S completo. Dentro de las 16 cepas aisladas se logró identificar únicamente a dos especies: *Lactobacillus fermentum* y *Enterococcus faecium* (A partir de 2020, *Lactobacillus fermentum* se reclasificó como *Limosilactobacillus fermentum* (Zheng *et al.*, 2020)), ambos microorganismos se han reportado en quesos elaborados con leche cruda (Silva *et al.*, 2015; Poznanski *et al.*, 2004; Mangia *et al.*, 2016).

En el 2018 Camacho Mata, realizó el análisis microbiológico de dos muestras de queso bola de Ocosingo, las cuales son provenientes del rancho Laltic, una bola grande y una bola chica. Los resultados son mostrados en la siguiente tabla. Es importante mencionar que los quesos que se analizaron por Camacho Mata son del mismo lote que los quesos analizados en este trabajo, por lo que se espera tener resultados consistentes.

Tabla 2. Análisis microbiológico de dos muestras de queso bola de diferente lote.

DETERMINACIÓN						
Mstra.	Mesófilos aerobios (UFC/g)	Mohos (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)
1	25x10 ⁶	<10	14x10 ⁶	7X10 ²	<10	8x10 ³
2	4x10 ⁶	<10	14x10 ⁶	16X10 ³	<10	23x10 ³
NOM-243-SSA1-2010	-	500	500	≤100	100	≤100

n=3

Los valores obtenidos fueron comparados con los de la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. La cuenta de levaduras y coliformes totales no cumplen con los parámetros y la cuenta de mesófilos aerobios resultó ser alta, sin embargo, hay que considerar que esta norma establece límites para aquellos quesos elaborados con leche pasteurizada. A pesar de haber obtenido una cuenta de *S. aureus* que no entra en la norma antes mencionada, no alcanza el número de UFC/g para que un alimento pueda provocar intoxicación de acuerdo a la Food and Drugs Administration (10^5 /g). El único parámetro dentro de la norma que cumple el queso bola de Ocosingo es la cuenta de *E. coli*, ya que se encontró ausencia de este microorganismo.

Camacho Mata también realizó el aislamiento de algunas BAL las cuales se identificaron por secuenciación del ADNr 16S completo. Las seis cepas aisladas del queso se identificaron como *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei* (a partir de 2020, *Lactobacillus plantarum* se reclasificó como *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei* como *Lacticaseibacillus paracasei* (Zheng et al., 2020)), ambos reportados en quesos (Licitra & Carpino, 2014).

Los cebadores a utilizar en este proyecto, fueron anteriormente manejados por integrantes del grupo de trabajo para evaluar la población microbiana de queso Cotija. En la Tabla 3 se muestran los cuatro pares de cebadores utilizados, la región que amplifican, así como los microorganismos encontrados en queso Cotija con cada uno. Con estos resultados se puede observar que existe diferencia en los microorganismos encontrados con cada par de cebadores y que se encontraron principalmente BAL, si se complementan estos resultados, al final se obtiene una extensa microbiota presente en este tipo de queso es por ello que se considera necesario utilizar más de un par de cebadores para complementar información y obtener un resultado más representativo de la comunidad bacteriana presente.

Tabla 3. Cebadores utilizados en el análisis de la comunidad bacteriana de queso Cotija y los microorganismos encontrados con cada uno.

REGION /GEN	CEBADORES	TAMAÑO PRODUCTO	REFERENCIA	MOOs
V3 16S	338F / B518R	180 pb	Casillas Hernández (2013)	<i>Vagococcus</i> sp, <i>Bacillus</i> sp, <i>Virgibacillus pantothenicus</i>
<i>rpoB</i>	rpoB1698F / rpoB2041R	343 pb		<i>Staphylococcus equorum</i> , <i>Streptococcus infantarius</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus suis</i>
V4-V7 16S	Pedio2:644 / FirR:1244	700 pb	Gómez Castelo (2010)	<i>Enterococcus asini</i> , <i>Enterococcus termitis</i> , <i>Vagococcus carniphilus</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Enterococcus haemoeroxidus</i>
V7-V8 16S	WBAC1 / WBAC2	~350 pb	Chombo Morales (2015)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Aerococcus viridians</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Weissella oryzae</i> , <i>Carnobacter alterfunditum</i> , <i>Lactobacillus mudanjiangensis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactobacillus farciminis</i> , <i>Lactobacillus acidipiscis</i> , <i>Psychrobacter celer</i> , <i>Corynebacterium variabile</i>

3. Justificación

Dado que el queso bola de Ocosingo es un queso madurado que se produce de manera artesanal, la calidad del queso y sus características dependen en gran parte de la microbiota proveniente de la leche, así como de microorganismos ambientales inoculados de manera involuntaria durante la fabricación. Hasta ahora los análisis microbiológicos realizados son dependientes de cultivo y proporcionan poca información sobre la composición de la comunidad bacteriana dominante en el producto final. De acuerdo con esto, surge el interés de obtener un panorama más completo sobre las bacterias presentes, utilizando PCR-DGGE con una posterior secuenciación, con fines comparativos se analizarán dos unidades diferentes de queso de un mismo productor.

4. Hipótesis

Al combinar la información obtenida sobre la identificación de bacterias utilizando la región V3 del ADNr 16S y una región de *rpoB* se tendrá una mayor diferenciación entre especies y un panorama más completo sobre las bacterias dominantes presentes en el queso bola de Ocosingo.

5. Objetivos

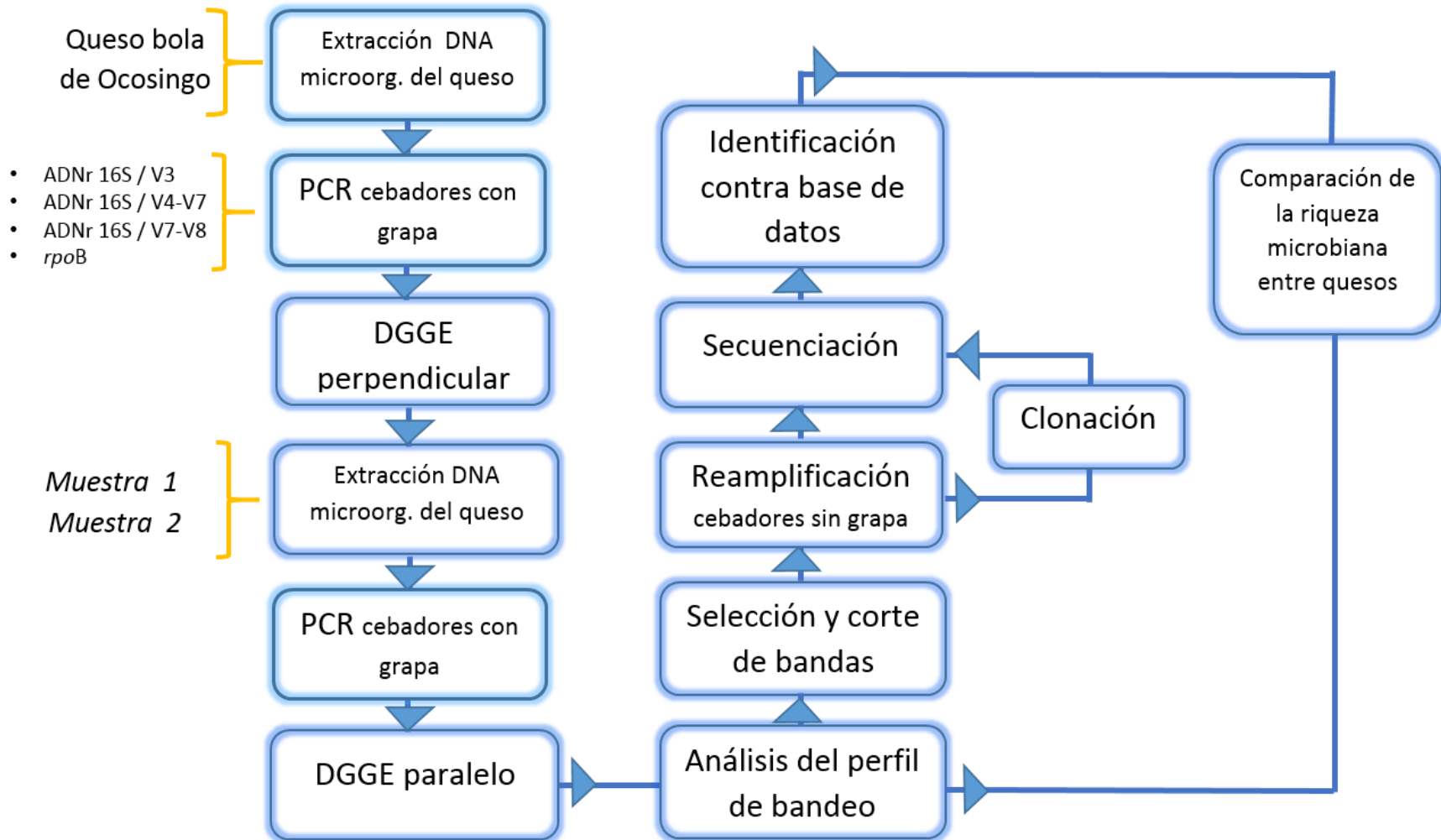
5.1. Objetivo general

Identificar la comunidad bacteriana dominante en queso bola de Ocosingo mediante la secuenciación parcial del ADNr 16S y *rpoB*.

5.2. Objetivos particulares

- i. Establecer las diferencias en el perfil de bandeo obtenido por DGGE para la microbiota bacteriana de dos quesos utilizando cuatro diferentes juegos de cebadores que amplifican distintas regiones:
 - *rpoB*1698F/*rpoB*2041R - *rpoB*
 - 338F/B518R - V3 ADNr 16S
 - Pedio2:644/FirR:1244 - V4-V7 ADNr 16S
 - WBAC1/WBAC2 - V7-V8 ADNr 16S
- ii. Establecer los parámetros de dominancia y riqueza específica para cada queso y para cada par de cebadores.
- iii. Identificar a las bacterias dominantes en ambas muestras de queso.

6. Diagrama experimental



7. Metodología

7.1. Descripción de las muestras

La primera parte de la metodología (extracción de ADN, PCR y DGGE perpendicular) se realizó con remanentes de un queso bola de Ocosingo que había sido utilizado para ensayos anteriores a este trabajo, con estos experimentos únicamente se establecieron las condiciones de extracción de ADN, condiciones de PCR y condiciones de gradiente desnaturalizante para geles de DGGE, las cuales fueron utilizadas en las muestras problema de queso.

Para las muestras problema se analizaron dos quesos bola de Ocosingo, ambos elaborados en el Rancho Laltic en la región de Ocosingo en el estado de Chiapas; un queso se encuentra en presentación de bola chica y el otro en presentación de bola grande, denominación que se utilizará en lo subsecuente (Figura 10). Los quesos bola de Ocosingo se mantuvieron en refrigeración (4°C). Las muestras analizadas fueron tomadas de la parte del núcleo de cada queso, de donde se realizó la extracción de ADN de los microorganismos.



Figura 10. Muestras de queso bola de Ocosingo provenientes del Rancho Laltic.

En el laboratorio se cuenta con cepas de *Enterococcus faecium* aislada de queso Cotija, así como cepas de *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactiplantibacillus*

plantarum y *Lacticaseibacillus paracasei* aisladas de queso bola de Ocosingo; los amplicones obtenidos con el ADN de estas cepas se utilizaron en los geles de DGGE paralelo como cepas de referencia para comparar el patrón de bandeo con los obtenidos de las muestras de queso (la obtención del paquete celular de las cepas de referencia se encuentra en el anexo A).

7.2. Recuperación del paquete celular microbiano a partir del queso

Para disgregar la red proteínica del queso, la muestra de queso fue tratada con proteasas y homogeneizada con ayuda de un Stomacher. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm para separar la grasa de la fase enriquecida de células de microorganismos y los fragmentos no digeridos del queso. Se llevó a cabo una segunda centrifugación a 8500 rpm para sedimentar a los microorganismos y el paquete celular se lavó con solución salina. Por último, los paquetes celulares se almacenaron a -20°C hasta su uso. El procedimiento detallado se encuentra en el Anexo B.

7.3. Extracción y purificación de ADN

La extracción y purificación del ADN del paquete celular microbiano obtenido del queso, así como de las cepas que se usaron como referencia, se realizó de acuerdo al protocolo del kit comercial Fast ID Genomic DNA Extraction Kit de Genetic ID. La extracción de ADN se logra por la ruptura celular por detergentes iónicos y se utiliza una membrana de sílica para unión y purificación de ADN. El protocolo detallado se encuentra en el Anexo C.

La concentración del ADN se obtuvo midiendo la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro para microplacas *Epoch* de BioTek, la relación de los valores de absorbancia (A) determinados a 260 y 280 nm se utilizó como índice de pureza.

7.4. Amplificación del fragmento del gen 16S ADNr y del gen *rpoB*

El ADN obtenido de las muestras de queso y de las cepas de referencia se utilizó para amplificar diferentes regiones del ADNr 16S utilizando los cebadores: 338F/B518R (V3), Pedio2:644/FirR:1244 (V4-V7) y WBAC1/WBAC2 (V7-V8), y para amplificar una región del gen *rpoB* con los cebadores *rpoB*1698F/*rpoB*2041R, uno de los cebadores de cada par tiene una secuencia de 40 nucleótidos de GC en la posición 5'. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de primers con y sin grapa.

REGIÓN/ GEN	CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	pb	REF.
V3 16S DNAr	338F-GC	CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGC CCCCGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAG	180 pb	Ampe <i>et al.</i> , 1999
	338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG		
	B518R	ATTACCGCGGCTGCTGG		
<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> 1698F- GC	CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGC CCCCGCCCCAACATCGGTTTGATCAAC	343 pb	Dahllöf <i>et al.</i> , 2000
	<i>rpoB</i> 1698F	AACATCGGTTTGATCAAC		
	<i>rpoB</i> 2041R	CGTTGCATGTTGGTACCCAT		
V4-V7 16S DNAr	Pedio2:644- GC	CGCCCCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGG GGCACGGGGGGGATTTATTGGGCGTAAAGC GA	700 pb	Rojas <i>et al.</i> , 2008
	Pedio2:644	GATTTATTGGGCGTAAAGCGA		
	FirR:1244*	TAGCCARGTCATAAGGGGCATG		
V7-V8 16S DNAr	WBAC1-GC	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGC CCCCGCCCCGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGA	350 pb	Lopez <i>et al.</i> , 2003
	WBAC1	GTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGA		
	WBAC2	CCCGGGAACGTATTCACCGCG		

Para las reacciones de PCR se utilizó la enzima AccuPOL™ DNA Polymerase de Ampliqon, siguiendo las instrucciones del proveedor, en la Tabla 5 se presenta la mezcla de reacción.

Tabla 5. Reactivos utilizados para la reacción de PCR.

Componente	Conc. Inicial	Conc. Final	50 µl de reacción
<i>Agua</i>			30.62 µl
<i>Buffer HF</i>	5X	1X	10 µl
<i>dNTP's</i>	10 mM	0.2 mM	1 µl
<i>Cebador F</i>	10 µM	0.3 µM	1.5 µl
<i>Cebador R</i>	10 µM	0.3 µM	1.5 µl
<i>Polimerasa</i>	2 U/µl	0.015 U/µl	0.375 µl
<i>DNA</i>	20 ng/µl	100 ng/µl	5 µl
TOTAL			50 µl

En las tablas AI y AII del Anexo, se muestran las condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos V3, V4-V7, V7-V8 del DNAr 16S y *rpoB* con cada par de cebadores, con y sin grapa.

Para verificar la presencia y tamaño de los amplicones obtenidos por PCR para los cuatro pares de cebadores, se corrieron geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio, se cargaron 2µl de buffer de carga + 6µl de muestra. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V, por 40 minutos utilizando como marcador de peso molecular GenRuler 50 bp DNA Ladder o MassRuler Low Range DNA Ladder de Thermofisher ; se visualizó en el transiluminador de UV y se documentó cada gel con el *ChemiDoc XRS* System (Bio-Rad).

7.5. DGGE perpendicular

Con los amplicones obtenidos a partir del ADN de los microorganismos de un queso bola de Ocosingo previamente existente en el laboratorio, se elaboraron los geles DGGE perpendiculares para cada par de cebadores.

Se utilizó el equipo DCode™ Universal Mutation Detection System apparatus de Bio-Rad. Se siguió el procedimiento descrito en el manual del equipo para preparar geles de 16 x 16 cm. Se depositaron 100 µg de los productos de amplificación a lo largo de un único pozo en un gel de acrilamida al 6, 8 o 10% dependiendo del porcentaje requerido de acuerdo con la tabla AIII (Anexo) y con un intervalo desnaturizante de 20% - 80%. Los reactivos utilizados, así como sus proporciones, se detallan en el Anexo (Tabla AIV). La electroforesis se corrió a 120 V por dos horas y media a 60°C en buffer TAE 1X. Posteriormente el gel se tiñó usando SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain.

7.6. Tinción SYBR Green vs plata

Se realizó una prueba para seleccionar la mejor metodología para teñir los geles de DGGE paralelo comparando la tinción con plata contra la tinción con SYBR green. Se preparó un gel de acrilamida al 10% con un gradiente desnaturizante de 30% - 60% y se dividió en dos, en ambas mitades del gel se cargaron las mismas muestras y la misma cantidad de ADN por carril. La electroforesis se realizó a 80V por 17 horas a 60° C en buffer TAE 1X. Pasado el tiempo de electroforesis se cortó el gel por la mitad, en una de ellas se utilizó SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain siguiendo las instrucciones del proveedor para la tinción y en la otra mitad se realizó la tinción con plata, el protocolo detallado se encuentra en el Anexo D.

7.7. DGGE paralelo

Para el DGGE paralelo se utilizaron los amplicones obtenidos de la PCR utilizando los cebadores con grapa en los cuales se utilizó como ADN molde el proveniente de los microorganismos de los quesos bola problema (bola chica y bola grande).

También se realizaron las reacciones de PCR para cinco diferentes cepas de microorganismos aislados de queso: *E. fecalis* aislado de queso Cotija, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactiplantibacillus plantarum*, y *Lactocaseibacillus paracasei* aisladas de queso bola de Ocosingo. Estas cepas se utilizarán como referencia.

Se utilizó el equipo DCode™ Universal Mutation Detection System apparatus de Bio-Rad. Se siguió el procedimiento descrito en el manual del equipo para preparar geles de 16 x16 cm y una capacidad para correr 16 muestras simultáneas. En los geles se depositaron 3 µg de ADN de los productos de amplificación de las muestras de queso, 2 µg totales de ADN para la mezcla de las cepas y 0.4 µg de ADN de los productos de amplificación de las cepas por separado, en todos los casos se agregó buffer de carga 2X (en una relación de volumen 1:2 ADN/buffer). Los reactivos utilizados, así como sus proporciones, se detallan en el Anexo Tabla AIV. La electroforesis se realizó a 80V, por 17 horas, a 60° C, en buffer TAE 1X, posteriormente los geles fueron teñidos con plata, se tomaron fotografías con ChemiDoc XRS System (Bio-Rad) y fueron analizados con el programa ImageLab de Bio-Rad.

7.8. Análisis del perfil de bandeo en DGGE paralelo

A partir de las fotografías obtenidas de los geles, se identificaron las bandas de cada carril con el software ImageLab. Con el perfil de bandeo obtenido se calcularon los siguientes parámetros:

Riqueza específica: es el número de especies presentes en la comunidad, corresponde al número de bandas por carril.

Dominancia relativa: La intensidad de las bandas en el análisis de DGGE de los amplicones, puede ser relacionada a la cantidad de ADN, por lo tanto, sería proporcional a la dominancia relativa de cada individuo presente en la muestra (Muzyer *et al.*, 1995; Van Hannen *et al.*, 1999). El dominio relativo (DR) es calculado como la suma de la intensidad relativa promedio (IRp) de cada banda (dado por el programa ImageLab) dividida entre el número de individuos que conforman la comunidad bacteriana de cada muestra. Este parámetro permite clasificar a los individuos de cada muestra como dominantes ($IRp \geq DR$) o no dominantes ($IRp \leq DR$).

Índice de similitud: El índice de similitud de Sørensen-Dice (S_D) es un valor utilizado para comparar comunidades con atributos similares. Es de los índices más utilizados y su valor va de 0 a 1, siendo 1 el valor que expresa completa similitud y a valores más bajos significa mayor diferenciación. Este valor es calculado a partir de una matriz de ausencia/presencia de bandas. Su ecuación es la siguiente:

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

Donde:

TotN_{AB}= número de bandas que comparten los dos carriles a considerar

N_A = número de bandas del carril A

N_B = número de bandas del carril B

Con el cálculo de estos tres parámetros se identificó qué par de cebadores dio una riqueza específica mayor, permitió determinar a las bandas dominantes en cada caso y se calcularon valores de similitud entre la bola chica y la grande.

7.9. Recuperación y reamplificación de ADN extraído de bandas individuales

Las bandas que resultaron ser dominantes con cada par de cebadores fueron cortadas y extraídas del gel, cada banda se colocó en un tubo eppendorf estéril de 600 µL, se resuspendió en 20 µL de buffer TE 1X, se incubó a 37°C por 1 hora y

posteriormente se mantuvo a 4°C una noche para que el ADN eluyera de la banda. El ADN recuperado se reamplificó con el par de cebadores sin grapa correspondiente para ser enviado a secuenciar.

7.10. Clonación

Para obtener secuencias homogéneas de la mayoría de las muestras, previo a la secuenciación se realizó la clonación del fragmento amplificado con los cebadores sin grapa en el vector de clonación pJET1.2/blunt de Thermofisher (Figura 11). Este plásmido acepta insertos de 6pb a 10kb, tiene el gen que confiere resistencia a ampicilina, que es útil para la selección de células transformadas y tiene un gen letal que es interrumpido en caso de que la ligación se realice con éxito, lo que permite la contra-selección de los plásmidos sin inserto. El kit utilizado fue CloneJET PCR Cloning, cuyas condiciones de reacción se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Mezcla para reacción de ligación.

Componente	Volumen
Buffer de reacción 2X	10 µL
Producto de PCR no purificado o Producto purificado *	1 µL 0.15 pmol
pJET 1.2/blunt (50 ng/ µL)	1 µL
Agua libre de nucleasas	-
T4 DNA ligasa	1 µL
Volumen total	20 µL

* Relación molar inserto vector 3:1

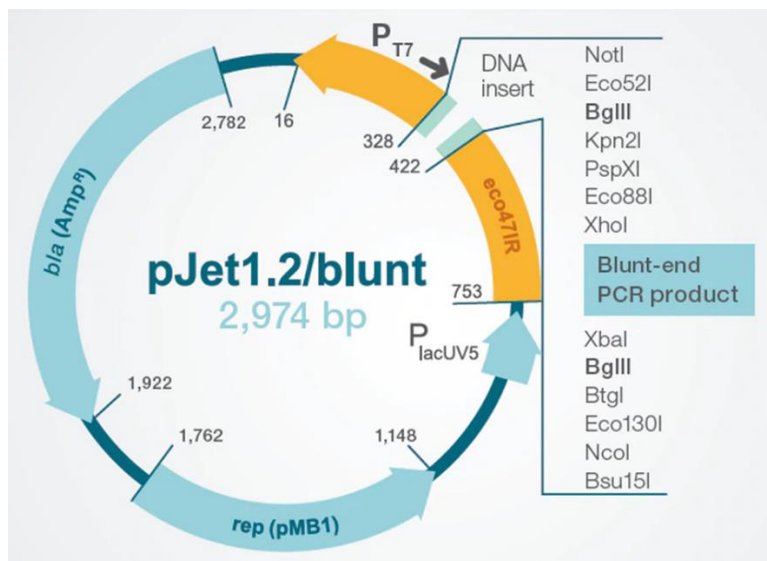


Figura 11. Vector de clonación pJet1.2/blunt.

La reacción de ligación se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente, para la transformación se transfirieron 2.5 μ L de la reacción de ligación a un tubo con 50 μ L de células competentes de *E. coli Mix & Go* de ZYMO RESEARCH, se agitó ligeramente e inoculó en medio LB con antibiótico (ampicilina). Las cajas se incubaron a 37° C toda la noche, al siguiente día se seleccionó una colonia la cual se inoculó en 5 mL de medio LB líquido más antibiótico y se incubó a 37° C y 250 rpm por 16 horas. Posteriormente se hizo la extracción de plásmido con el kit GeneJET Plasmid Miniprep de ThermoFisher, siguiendo las instrucciones del proveedor.

El vector se linearizó utilizando la enzima XhoI de Thermofisher para corroborar la presencia del inserto (condiciones mostradas en el Anexo tabla AV). El plásmido recuperado se reamplificó con el par de cebadores sin grapa correspondiente.

7.11. Purificación de productos de PCR y secuenciación

Los productos de PCR obtenidos de la reamplificación del ADN extraído directamente de las bandas del gel de DGGE fueron purificados con el Kit DNA Clean & Concentrator™-5 (ZYMO RESEARCH), mientras que los productos de PCR

obtenidos de la reamplificación del vector de clonación fueron purificados con el kit QIAEXII® Gel Extraction de QIAGEN. Las muestras purificadas se enviaron para su secuenciación a MACROGEN, Seúl, Corea y fueron secuenciadas con los cebadores sin grapa de la tabla 3.

7.12. Análisis para la identificación de bacterias

Para cada banda se obtuvo una secuencia consenso comparando la secuencia obtenida con el cebador directo y el cebador inverso utilizando el programa DNADynamo. Las secuencias consenso obtenidas se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante un alineamiento con el uso de la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, análisis realizado en abril del 2020) seleccionando la identificación con el mayor porcentaje de cobertura e identidad. Para las muestras en las que se amplificó alguna región del gen ribosomal 16S se compararon los resultados obtenidos del BLAST contra RDB (Ribosomal Database) para asegurar que los resultados fueran consistentes.

7.13. Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos se realizaron por separado para cada fragmento ribosomal y de *rpoB* utilizado, a su vez se desglosaron en bacterias Gram positivas y Gram negativas en caso de ser necesario. La relación filogenética fue inferida con el programa MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar *et al.*, 2018) usando el método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), el árbol consenso fue obtenido por bootstrap con 1000 remuestreos y representa la relación entre las cepas analizadas. El valor que se muestra junto al nodo de donde derivan las ramas del árbol corresponde al porcentaje en el que fueron asociadas las secuencias durante el análisis por bootstrap (Felsenstein, 1985). Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993). El

análisis involucró tanto a las secuencias problema como secuencias de referencia tomadas del NCBI.

8. Resultados y discusión

8.1. Establecimiento de las condiciones de extracción de ADN de los microorganismos del queso

De remanentes del centro de un queso bola de Ocosingo conservado en el laboratorio se realizó la extracción del ADN de los microorganismos, la concentración de ADN obtenida fue de 60.22 ng/μl y una relación de absorbancia $A_{260/280}$ de 2.03, este valor indica que el ADN extraído es de pureza óptima.

La muestra de ADN se cargó en un gel de agarosa al 1% para verificar su integridad (Figura 12), se observa una banda con un barrido, lo que sugiere que el ADN se podría encontrar degradado, sin embargo, los amplicones que se esperan para la PCR son de tamaño pequeño (entre 180 pb y 700pb) por lo que se prosiguió con los experimentos.

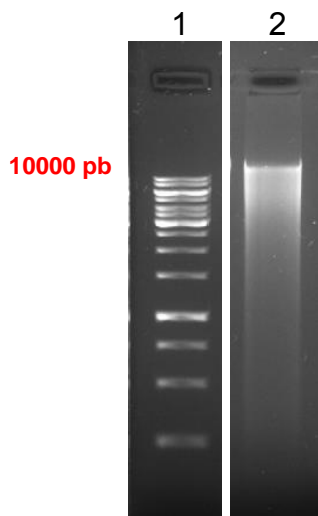


Figura 12. ADN de microorganismos del queso. Gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador GeneRuler 1kb DNA Ladder, carril 2: ADN extraído de microorganismos del queso.

8.2. PCR cebadores con grapa

Una vez que se comprobó la integridad y pureza del ADN extraído se prosiguió a realizar la PCR para cada par de cebadores con grapa (-GC), los amplicones obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio

(Figura 13). En la imagen se puede observar que los amplicones obtenidos tienen el tamaño esperado, sin embargo, para los cebadores que amplifican la región V7-V8 y V4-V7 del ADNr 16S hay presencia de una banda adicional a la esperada, que podría corresponder a la formación de productos inespecíficos, de acuerdo con Nocker y colaboradores (2006) la presencia de la grapa en el extremo 5' de los cebadores tiende a incrementar el riesgo de generación de productos inespecíficos en los pasos de alineamiento y formación de heteroduplex. En los experimentos previos sobre la microbiota del queso Cotija (Chombo Morales, 2015) donde se usaron estos cebadores también se reporta la presencia de estas mismas bandas sin que hubieran causado problema con los análisis y en ambos casos la banda de interés es la más intensa.

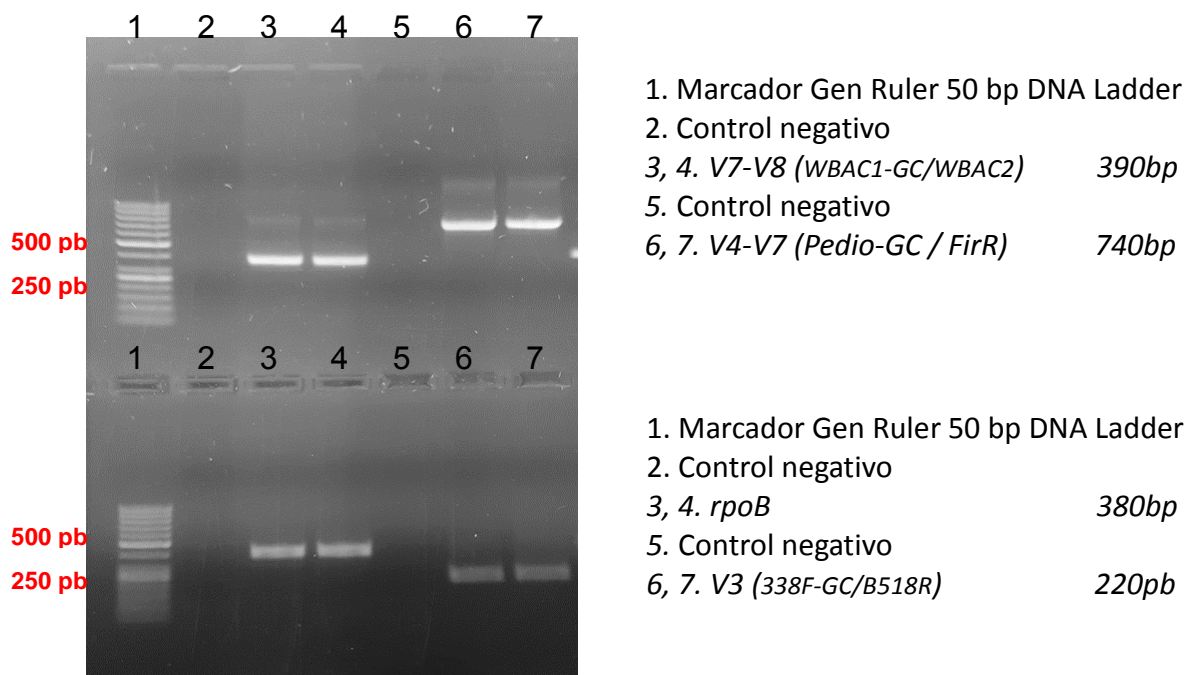
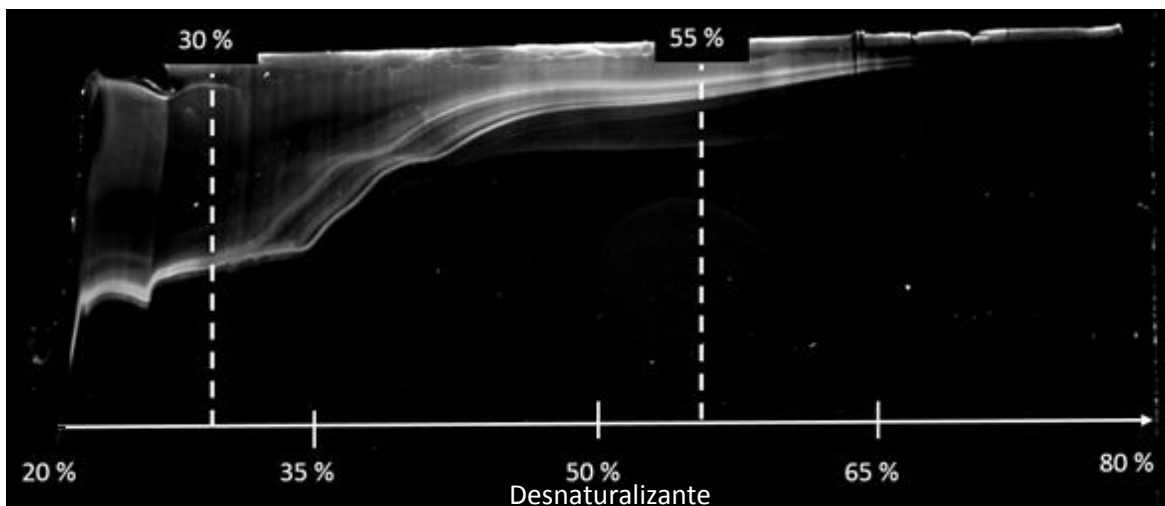


Figura 13. Productos de PCR de primers con grapa GC. Gel de agarosa al 1.5%.

8.3. DGGE perpendicular

Los amplicones obtenidos en el paso anterior se utilizaron para realizar los geles DGGE perpendiculares respectivos, uno por par de cebadores, utilizando el porcentaje de acrilamida correspondiente para el tamaño del fragmento (Figura 14).

V7-V8 (WBAC1-GC/WBAC2) / acrilamida al 8%



V4-V7 (Pedio2:644-GC/FirR:1244) / acrilamida al 6%

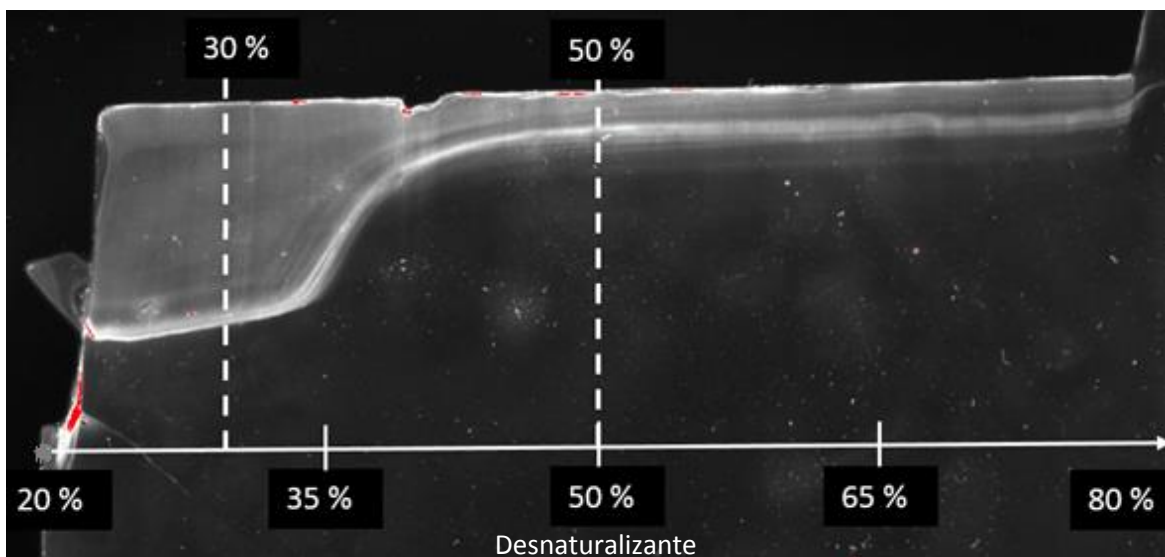
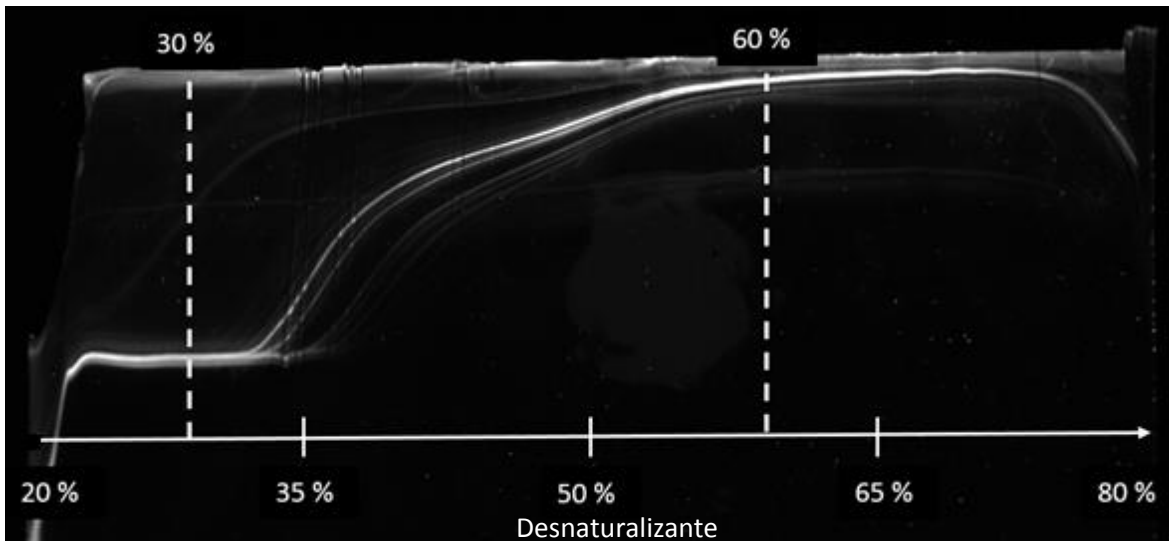


Figura 14. DGGE paralelo con los intervalos desnaturalizantes seleccionados. Tinción con SYBR green. Panel superior región V7-V8 (WBAC1-GC/WBAC2) / acrilamida al 8%, panel inferior región V4-V7 (Pedio2:644-GC/FirR:1244) / acrilamida al 6% .

V3 (338F-GC/B518R) / acrilamida al 10%



rpoB (rpoB1698F-GC/rpoB2041R) / acrilamida al 8%

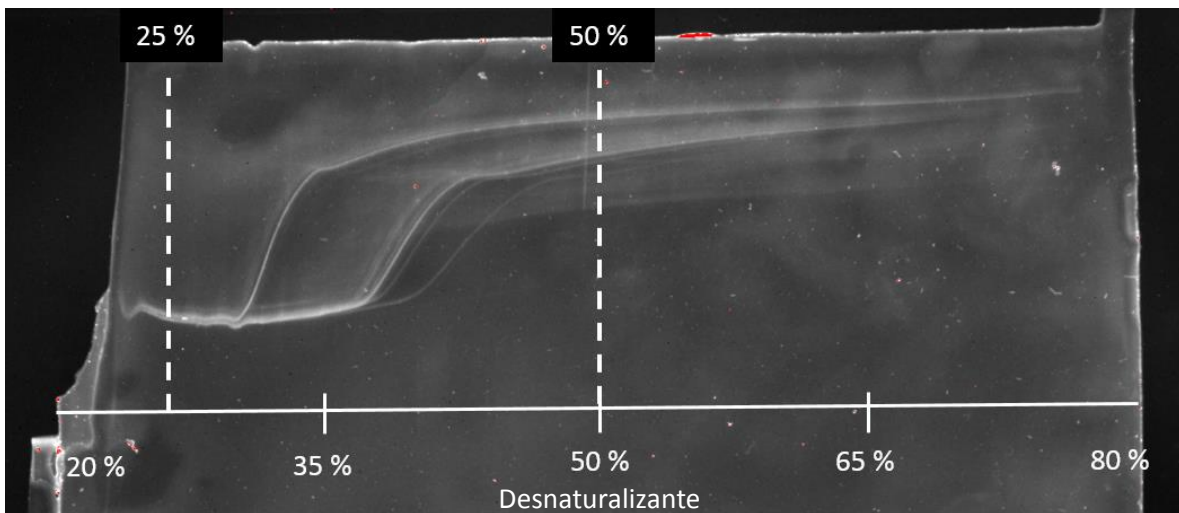


Figura 14 continuación. DGGE paralelo con los intervalos desnaturalizantes seleccionados. Tinción con SYBR green. Panel superior región V3 (338F-GC/B518R) / acrilamida al 10%, panel inferior fragmento de *rpoB* (rpoB1698F-GC/rpoB2041R) / acrilamida al 8%.

Los intervalos de gradiente desnaturante seleccionado (marcado con líneas punteadas) donde se observa la sigmoide son: para la región V7-V8 (WBAC1-GC/WBAC2) de 30%-55%, para V4-V7 (*Pedio-GC/FirR*) de 30%-50%, para V3 (*338F-GC/B518R*) de 30%-60% y para *rpoB* (*rpoBF-GC/rpoBR*) de 25%-50%. Con estos rangos seleccionados se realizaron los geles de DGGE paralelo para las dos muestras problema de queso bola de Ocosingo.

8.4. Extracción ADN microorganismos de queso bola chica y bola grande

Se realizó la extracción de ADN de los microorganismos de los quesos problema (bola chica BC y bola grande BG), en la Tabla 7 se muestran los valores de concentración de ADN obtenidos, así como la relación de la absorbancia $A_{260/280}$ para cada uno, en la Figura 15 se muestra el gel de agarosa para corroborar la integridad del ADN obtenido.

Tabla 7. Valores de concentración y pureza de ADN para las muestras de queso bola.

Muestra	Concentración (ng/μl)	$A_{260/280}$
QBC.1	76.705	2.017
QBC.2	81.644	2.035
QBC.3	83.397	1.910
QBG.1	118.499	1.995
QBG.2	113.120	1.886
QBG.3	87.828	1.945

Los valores de la relación de absorbancia $A_{260/280}$ se encuentran en el rango 1.886 a 2.035, esto indica una buena pureza del ADN obtenido. En el gel de agarosa se puede observar que el ADN probablemente se encuentre degradado; sin embargo,

como se mencionó anteriormente, el tamaño de los amplicones que esperamos es pequeño (180pb a 700 pb), por lo que el ADN se utilizó para realizar las PCR con los correspondientes cebadores con grapa.

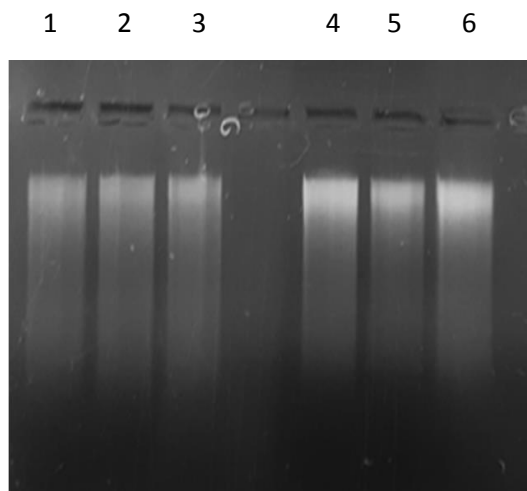
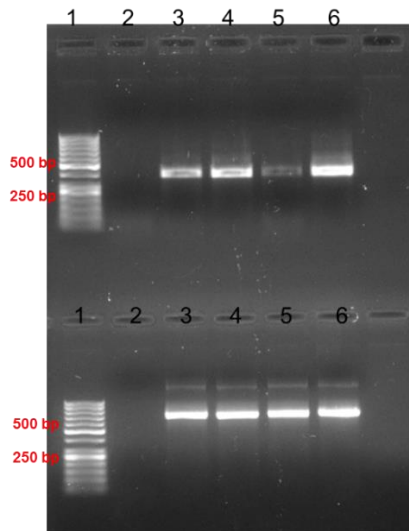


Figura 15. ADN extraído de los microorganismos de los quesos problema. Gel de agarosa al1%. Carril 1: QBC.1, carril 2: QBC.2, carril 3: QBC.3, carril 4: QBG.1, carril 5: QBG.2, y carril 6: QBG.3.

8.5. PCR cebadores con grapa

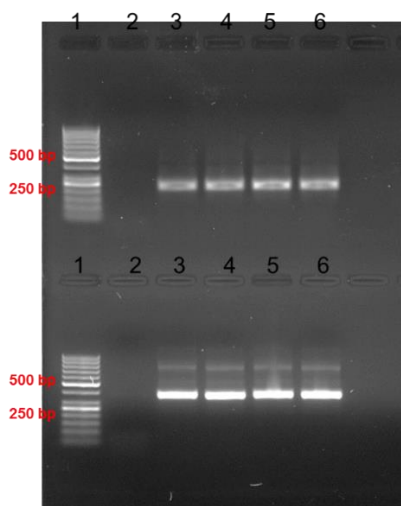
El ADN extraído de los microorganismos del queso se utilizó como molde para la amplificación de las tres diferente regiones del ADNr 16S y un fragmento del gen *rpoB* (Figura 16), también se realizaron las reacciones de PCR para amplificar los fragmentos antes mencionados de las cinco diferentes cepas de microorganismos aislados de queso, mencionadas en el punto 7.7 y que se utilizaron como referencia (Figura 17).

Tanto en la figura 16 como 17, se observa que en las muestras en las que se amplificó la región V7-V8 y V4-V7 del ADNr 16S se detectó nuevamente la presencia de dos amplicones, como se explicó anteriormente, el más intenso es el de interés por lo que se prosiguió con el DGGE paralelo. En las demás amplificaciones se observa la presencia de una única banda del tamaño esperado.



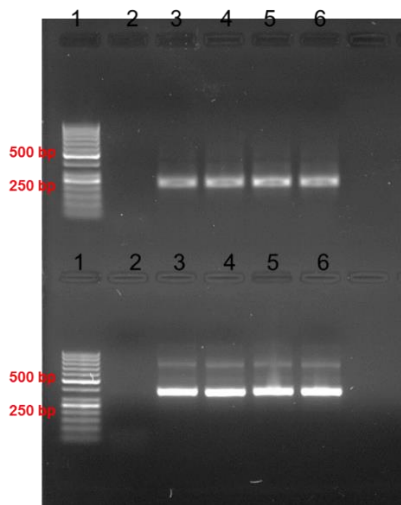
***rpoB* 380bp**

1. Marcador Gen Ruler 50 bp DNA Ladder
2. Control negativo
- 3-4. Bola chica
- 5-6. Bola grande



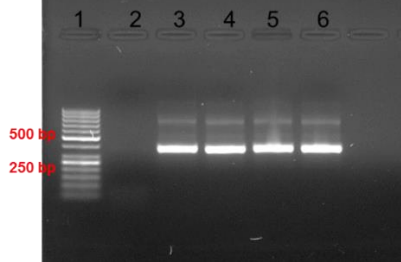
V4-V7 (Pedio-GC/FirR) 740bp

1. Marcador Gen Ruler 50 bp DNA Ladder
2. Control negativo
- 3-4. Bola chica
- 5-6. Bola grande



V3 (338F-GC / B518R) 220 bp

1. Marcador Gen Ruler 50 bp DNA Ladder
2. Control negativo
- 3-4. Bola chica
- 5-6. Bola grande



V7-V8 (WBAC1-GC/WBAC2) 390bp

1. Marcador Gen Ruler 50 bp DNA Ladder
2. Control negativo
- 3-4. Bola chica
- 5-6. Bola grande

Figura 16. Productos de PCR de cebadores con grapa. ADN molde proveniente de microorganismos de los quesos problema. Gel de agarosa al 1.5%.

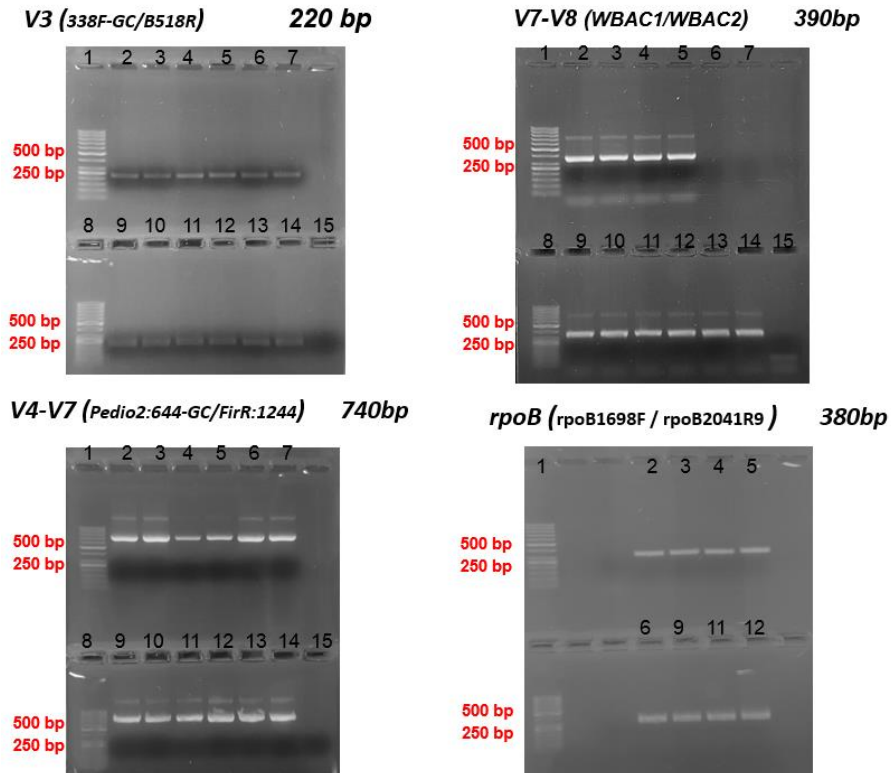


Figura 17. Productos de PCR de cebadores con grapa. ADN molde proveniente de cepas puras. Gel de agarosa al 1.5%. Carril 1 y 8: marcador Gen Ruler 50 bp DNA Ladder, carril 2 y 3: *E. fecalis*, carril 4 y 5: *Limosilactobacillus fermentum*, carril 6 y 7: *Lactiplantibacillus plantarum*, carril 9 y 10: *Lactiplantibacillus plantarum*, carril 11 y 12: *Lacticaseibacillus paracasei*, carril 13 y 14: *Lacticaseibacillus paracasei*, carril 15: control negativo.

8.6. DGGE paralelo y comparación entre las tinciones SYBR green y plata

Con el producto de PCR que amplificó la región V3 del ADNr 16s se realizaron los experimentos de DGGE paralelo y los geles fueron teñidos con SYBR Green y plata. Con ambas tinciones se puede observar el mismo patrón de bandeo tanto para la muestra de queso como para las cepas de referencia y la mezcla de éstas (Figura 18); también es posible observar que las bandas más intensas, así como las menos intensas, son las mismas con ambas tinciones. En la Figura 18 en el gel teñido con SYBR green en el carril 4 y 5 aparecen algunas bandas muy tenues en la parte inferior que son más visibles en el gel teñido con plata, por esa razón, en adelante

todos los geles de DGGE paralelo fueron teñidos con plata. Una vez que se obtuvo el gradiente desnaturalizante adecuado para cada par de cebadores y el tipo de tinción a utilizar, se procedió a realizar los geles DGGE paralelos.

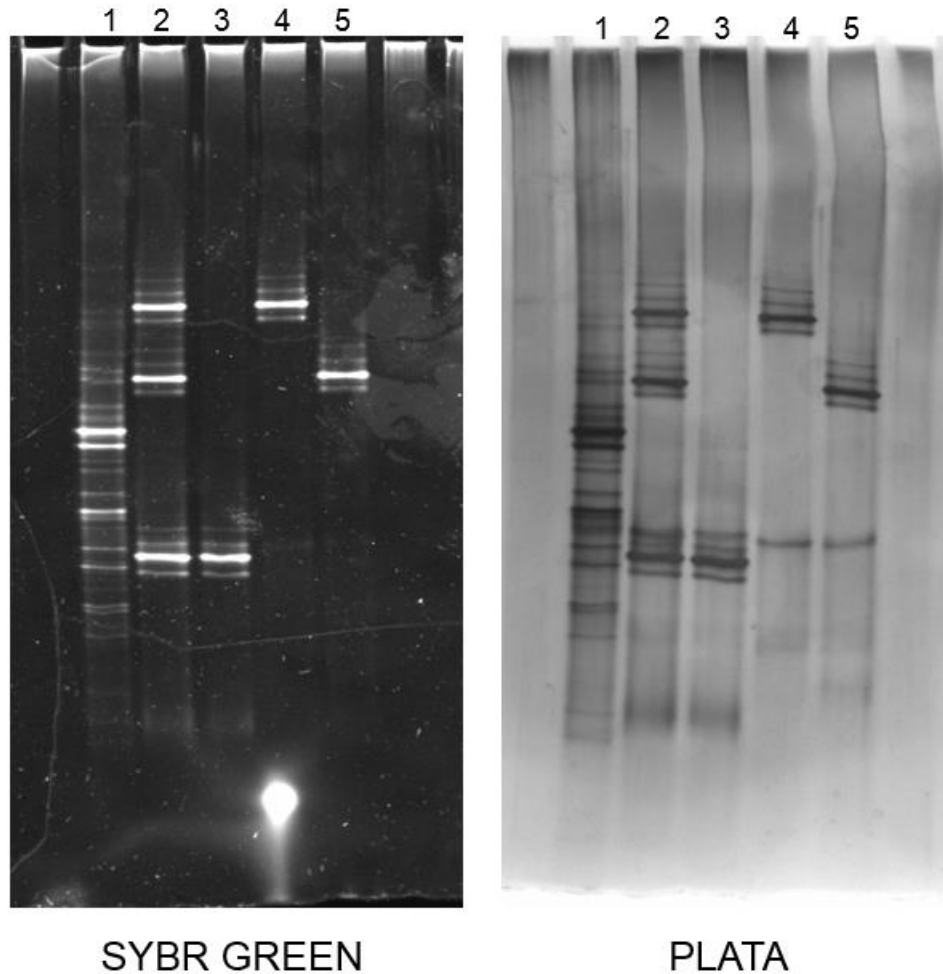


Figura 18. Comparación de gel DGGE obtenido con el producto de PCR que amplificó la región V3 del ADNr 16S, teñido con SYBR green y plata. Carril 1: Queso (3µg ADN), carril 2: Mezcla de cepas puras (3µg ADN total), carril 3: *Enterococcus faecalis* (1µg ADN), carril 4: *Limosilactobacillus fermentum* (1µg ADN) y carril 5: *Lactocaseibacillus paracasei* (1µg ADN).

8.7. DGGE paralelo y análisis del perfil de bandeo

En los geles se cargaron 3 µg de ADN para las muestras de queso, 2 µg de ADN total para la mezcla de cepas y 0.4 µg de ADN por cada cepa.

En un primer experimento se realizaron los cuatro geles de DGGE paralelo con los gradientes desnaturalizantes seleccionados a partir de los experimentos mostrados en la Figura 14. En los geles obtenidos se observó que las bandas se encontraban poco separadas en la parte central del gel (imágenes no mostradas) por lo que se modificaron las concentraciones de los agentes desnaturalizantes para poder observar una mejor resolución de bandas. En la siguiente tabla (Tabla 8) se muestran los intervalos desnaturalizantes seleccionados.

Tabla 8. Modificación en la concentración del intervalo desnaturalizante

Región amplificada	Concentración desnaturalizante (%)	Concentración desnaturalizante modificada (%)
V3	30-60	35-55
<i>rpoB</i>	25-50	30-40
V4-V7	30-50	35-45
V7-V8	30-55	35-50

Con los nuevos intervalos se realizaron nuevamente los geles de DGGE paralelo. A continuación, se presentan los geles realizados con el gradiente modificado y el análisis para cada uno. En todos los casos se utilizó la misma cantidad de ADN para el queso, la mezcla de cepas y cepas por separado mencionadas anteriormente. Se realizó la detección de bandas con ayuda del programa ImageLab y se presentó el patrón de bandeo en forma digital para un mejor manejo de datos, en este formato las bandas que se perciben más intensas en el gel se muestran como las líneas más gruesas mientras que las bandas más tenues visualizadas en el gel se muestran como las líneas más delgadas. También se indican (a excepción del gel para la región amplificada V3) con flechas verdes las bandas identificadas. En la forma digital se indica el número de bandas encontradas que corresponde al valor de riqueza específica; están marcadas con rojo las bandas que resultaron

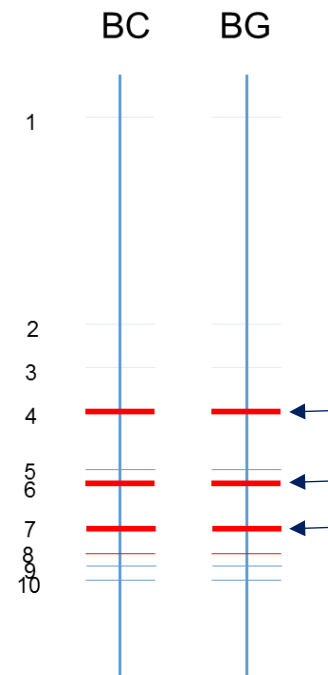
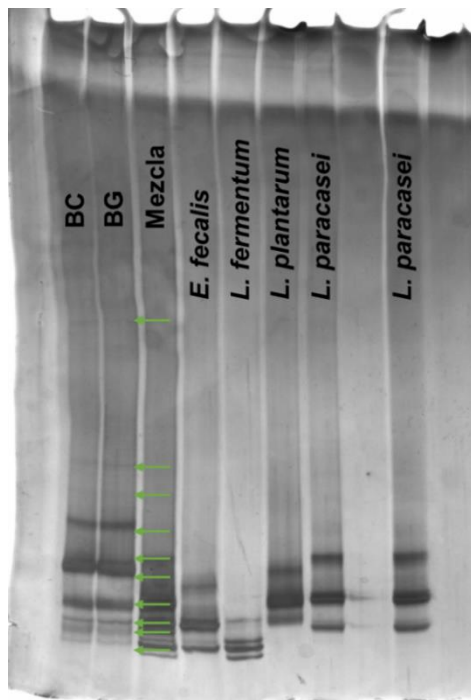
dominantes y con flechas negras se señalan las bandas que fueron seleccionadas para cortar, reamplificar y secuenciar (más adelante se explica con detalle la selección de las bandas dominantes).

En la Figura 19, en los geles donde se utilizaron las regiones amplificadas V4-V7, V7-V8 y V3 se observó que el patrón de bandeo para ambas muestras de queso (BC y BG) es el mismo. Para el gel con la amplificación de una región de *rpoB*, en la muestra BC se encontraron cinco bandas que no son visibles en la muestra BG, las bandas extras presentes en BC son muy tenues por lo que se consideró que en este caso ambas muestras son iguales y la ausencia de algunas bandas tenues se debe principalmente a errores de pipeteo con lo cual posiblemente la cantidad de ADN cargado en los carriles tuvo una ligera variación.

Dahlöf y colaboradores en el año 2000 realizaron una comparación en los perfiles de DGGE obtenidos de aislamientos de rocas y 10 cepas de laboratorio basados en DNAr 16S y *rpoB*, encontraron que para todos los aislamientos de rocas y seis de diez cepas de laboratorio mostraron múltiples bandas para el DNAr 16S, por otra parte no hubo indicios de heterogeneidad ni para los aislados de roca ni para las cepas de laboratorio cuando se utilizó *rpoB*. Este fenómeno se pudo observar en los bandeos obtenidos para las cepas de referencia, al amplificar alguna región o regiones del gen ribosomal 16S se obtiene más de una banda por cepa, esto confirma que este gen es posible encontrarlo en más de una copia y que las copias codificadas por un mismo genoma tienen cierto grado de heterogeneidad. Caso contrario, en la amplificación de una región del gen *rpoB* que es considerado de copia única, en el perfil de DGGE para las cepas de referencia se observa una sola banda lo cual ayuda a evitar problemas de heterogeneidad como en el DNAr16S.

Comparando los patrones de bandeo de las cepas de referencia con los quesos problema para una identificación tentativa de las bacterias presentes, solamente el patrón de bandeo obtenido por *L. plantarum* parece coincidir y únicamente para las regiones V4-V7 y V7-V8. En el caso de la región V3 y *rpoB* ningún patrón de bandeo de las cepas de referencia coincide con los obtenidos para ambas muestras de queso.

A) Región V4-V7 (Pedio-GC/FirR)



B) Región V7-V8 (WBAC1-GC/WBAC2)

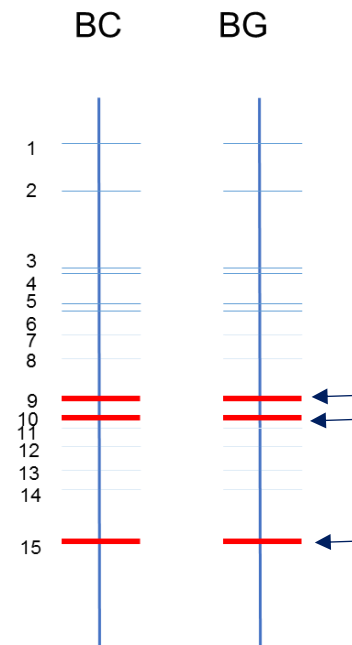
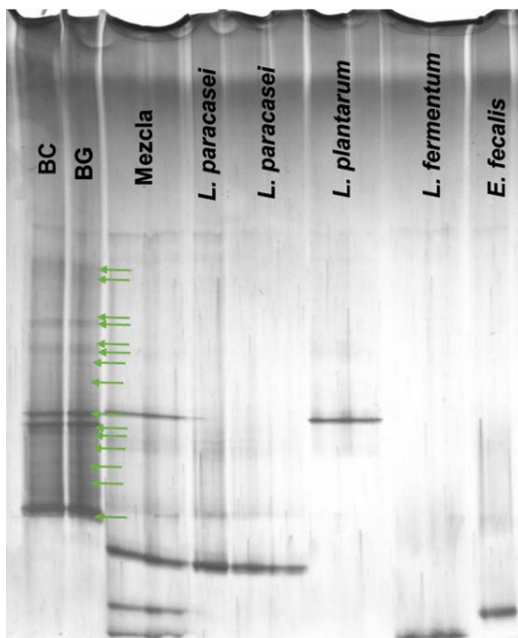
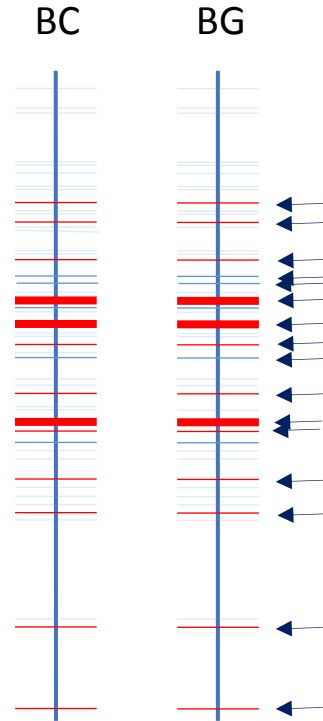
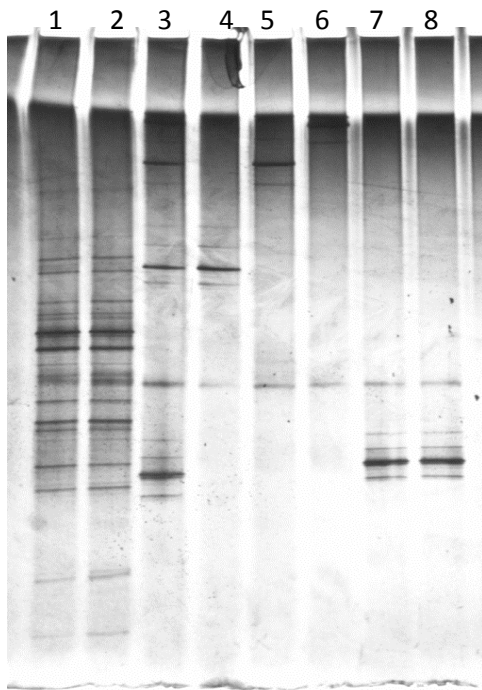


Figura 19. Geles de DGGE paralelo. A) Región amplificada V4-V7 (Pedio-GC/FirR), B) Región amplificada V7-V8 (WBAC1-GC/WBAC2).

C) Región V3 (338F-GC/B518R)



D) Fragmento del gen *rpoB* (*rpoB*1698F-GC/*rpoB*2041R)

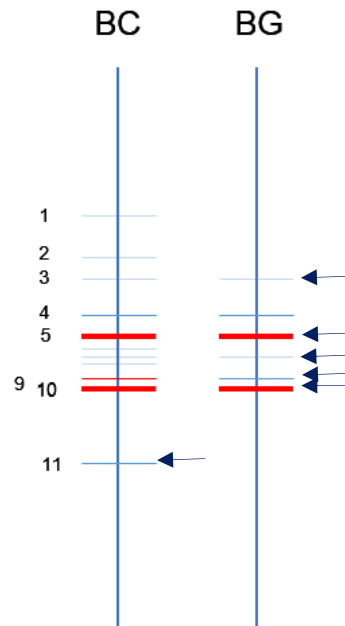
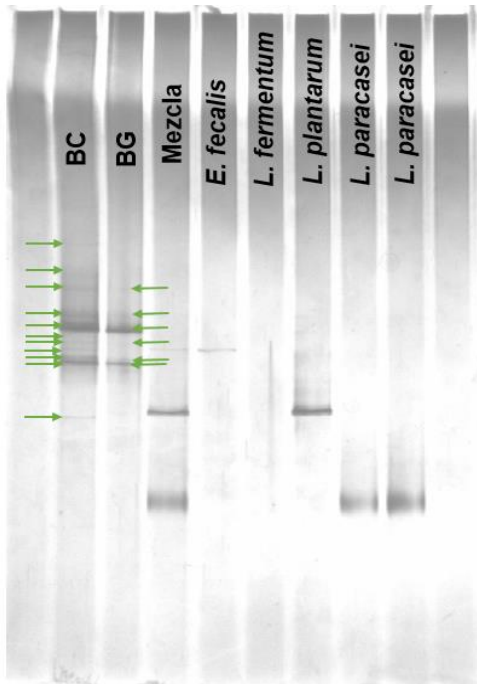


Figura 19 continuación. Geles de DGGE paralelo. C) Región amplificada V3 (338F-GC/B518R), carril 1: BC, carril 2: BG, carril 3: mezcla de cepas puras, carril 4: *E. fecalis*, carril 5: *L. fermentum*, carril 6: *L. plantarum*, carril 7: *L. paracasei*, carril 8: *L. paracasei*. D) Fragmento del gen *rpoB* (*rpoB*1698F-GC/*rpoB*2041R).

❖ Índice de similitud Sørensen-Dice

En la Tabla 9 se muestran los valores calculados del Índice Sørensen-Dice, se obtuvo un valor de 1 para todos los casos, indicando una total similitud entre muestras, a excepción de *rpoB* y cuyo caso, como se explicó anteriormente, se considerará que las muestras son iguales.

Tabla 9. Valores de Índice Sørensen-Dice.

Región amplificada	Índice Sørensen-Dice
V4-V7	$2(10) / (10+10) = 1$
V7-V8	$2(15) / (15+15) = 1$
V3	$2(49) / (49+49) = 1$
<i>rpoB</i>	$2(6) / (11+6) = 0.7$

❖ Riqueza específica

Al comparar los valores de riqueza específica de las regiones amplificadas (Figura 19), se observó que la región V3 es la que tiene el valor más alto con 49, el valor más bajo se encontró al amplificar la región V4-V7 con 10, con las regiones *rpoB* y V7-V8 se obtuvieron valores de 11 y 15, respectivamente. Teóricamente, estos valores indican la cantidad de OTUs (Unidad Taxonómica Operativa) que sería posible encontrar. Sin tomar en cuenta la heterogeneidad del gen ribosomal 16S, se esperaría encontrar mayor número de especies bacterianas al amplificar la región V3 y el menor número de especies con la región V4-V7 y *rpoB*.

❖ Dominancia relativa

La intensidad relativa de cada banda en el gel fue determinada utilizando el programa ImageLab, con esos valores fue posible diferenciar a la población

dominante de la no dominante (tablas AVI del Anexo) En la Figura 20 se muestran las gráficas en las cuales la línea horizontal roja representa el valor calculado de Dominancia Relativa (DM), las bandas cuyo valor de Intensidad Relativa promedio (IRp) está por encima de esta línea se consideran dominantes mientras que las bandas cuyo valor de Intensidad Relativa promedio está por debajo, se consideran no dominantes.

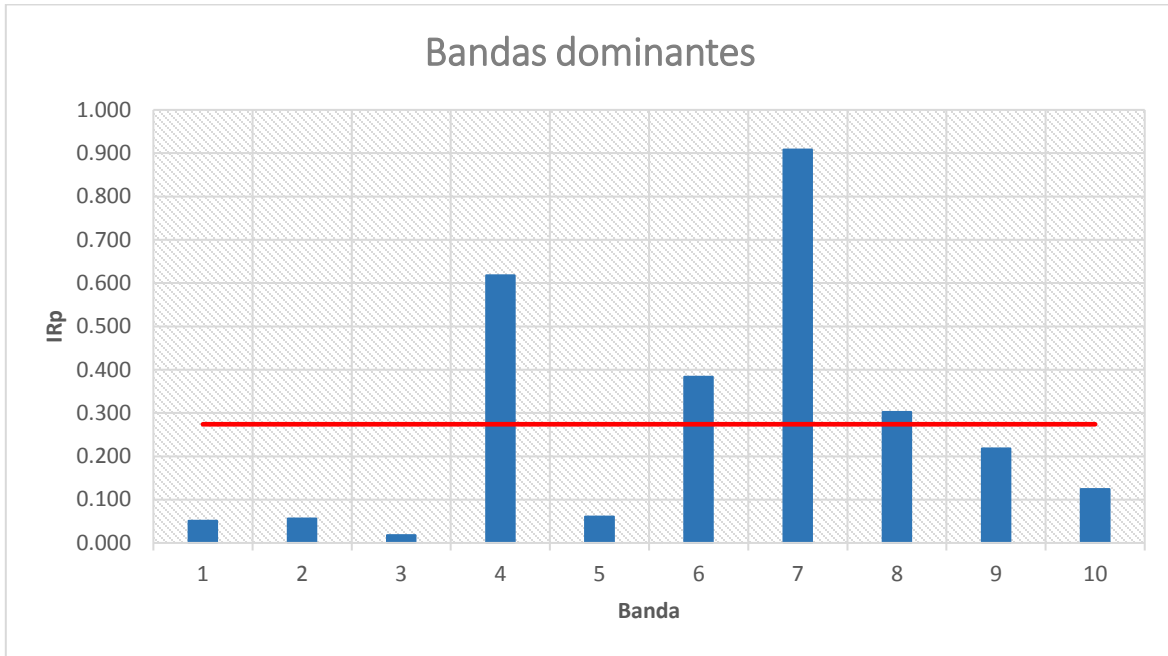
Para la región amplificada V4-V7 las bandas dominantes son las marcadas con los números 4, 6, 7 y 8. En el caso de la región amplificada V7-V8 las bandas dominantes son las números 9, 10 y 15. La región amplificada de *rpoB* dio como bandas dominantes a las números 5, 9 y 10 y con la región V3 se obtuvo el mayor número de bandas dominantes: 9, 12, 17, 21, 24, 27, 32, 35, 36, 40, 44, 47 y 49. Todas las bandas dominantes están marcadas con líneas rojas en la forma digital de los geles, en la Figura 19.

Para tener una mejor visión sobre qué pares de cebadores dan información más completa sobre la composición de la comunidad bacteriana, todas las bandas que resultaron dominantes se reamplificaron y fueron secuenciadas para saber su identidad, en algunos casos algunas otras bandas no dominantes también fueron seleccionadas (para *rpoB* se añadieron a la secuenciación las bandas 3, 7 y 11 y para V3 las bandas 18, 19 y 29). La notación utilizada para las bandas secuenciadas aparece en la siguiente tabla (Tabla 10):

Tabla 10. Bandas seleccionadas para secuenciar.

Región amplificada	Bandas secuenciadas
V4-V7	FC4, FC6, FC7, FC8
V7-V8	WC9, WC10, WC15
V3	VC1, VC2, VC3, VC4, VC5, VC6, VC7, VC8, VC9, VC10, VC11, VC12, VC13, VC14, VC15, VC16
<i>rpoB</i>	RC3, RC7, RC9, RC11, RG5, RG10

A) Región amplificada V4-V7



B) Región amplificada V7-V8

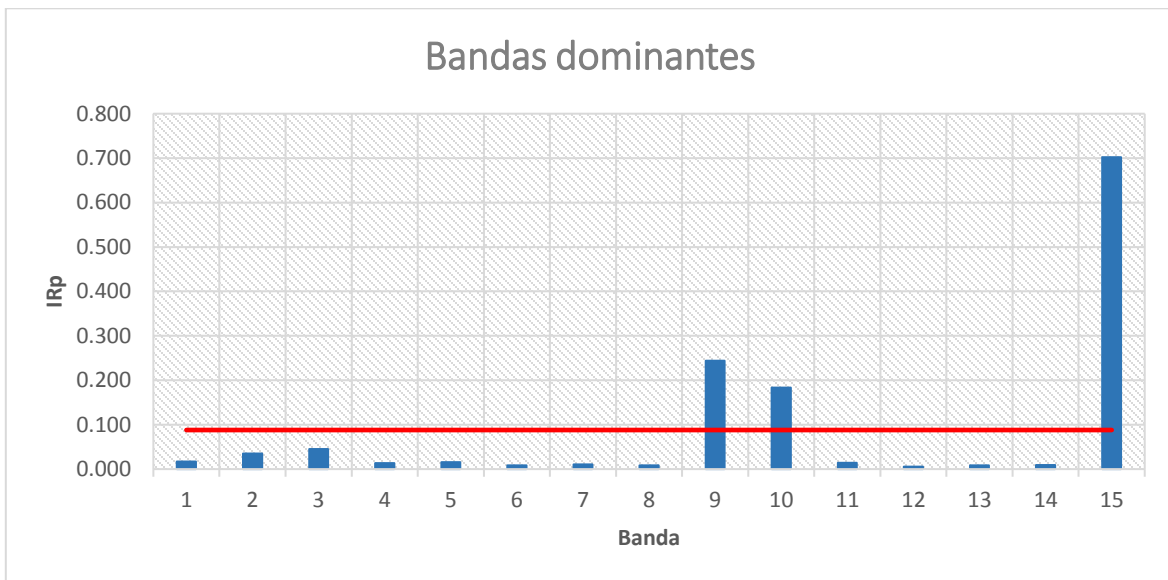
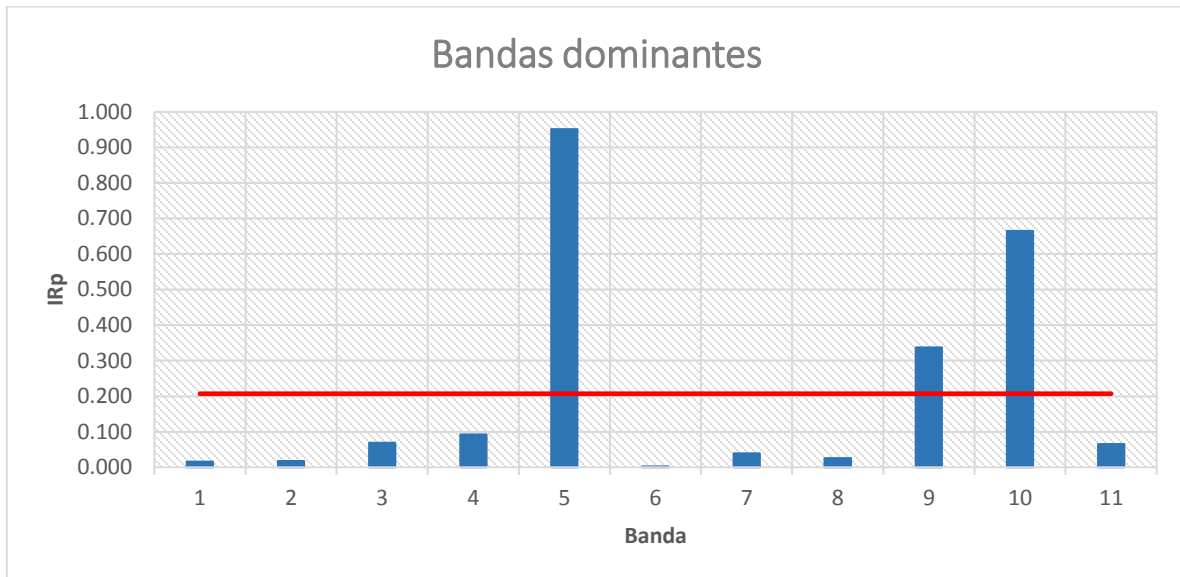


Figura 20. Bandas dominantes. A) Región amplificada V4-V7, B) Región amplificada V7-V8, C) Fragmento amplificado de rpoB, D) Región amplificada V3.

C) Fragmento amplificado de *rpoB*



D) Región amplificada V3

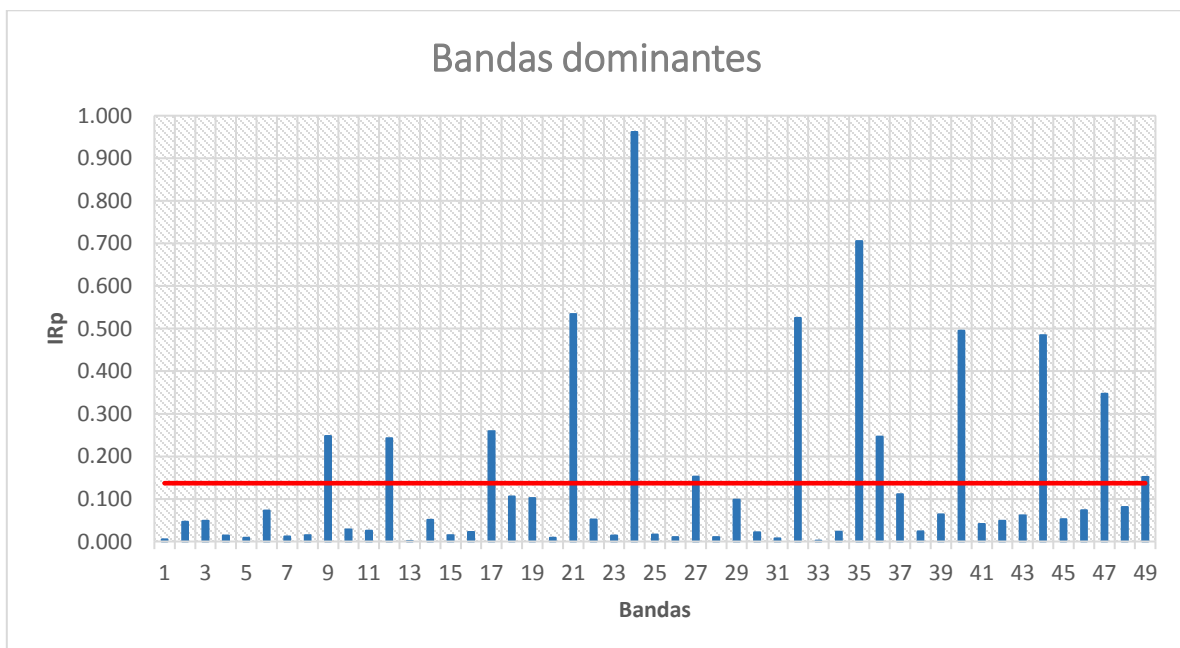


Figura 20 cont. Bandas dominantes. A) Región amplificada V4-V7, B) Región amplificada V7-V8, C) Fragmento amplificado de *rpoB*, D) Región amplificada V3.

En total 29 bandas fueron elegidas y se decidió separarlas en dos grupos para mandar a secuenciar (un grupo de 15 muestras y un grupo de 14).

8.8. Recuperación y reamplificación de ADN extraído de bandas individuales

Una vez recuperado el ADN de las bandas cortadas, este se utilizó como molde para una reamplificación con los cebadores sin grapa, de aquí se obtuvieron amplicones que visualizados en un gel de agarosa dieron una única banda del tamaño esperado por lo que se realizó la purificación directamente del producto de PCR para posteriormente enviar a secuenciar.

De las 14 muestras enviadas a secuenciar en una primera vuelta, solamente las muestras WC9, WC10 y WC15 (las tres provenientes del gel de DGGE con la amplificación de la región V7-V8) dieron electroferogramas de buena calidad y con los cuales fue posible continuar con el análisis para obtener una secuencia consenso. El amplicón obtenido de la PCR para estas tres muestras y que después fue purificado se presenta en la Figura 21.

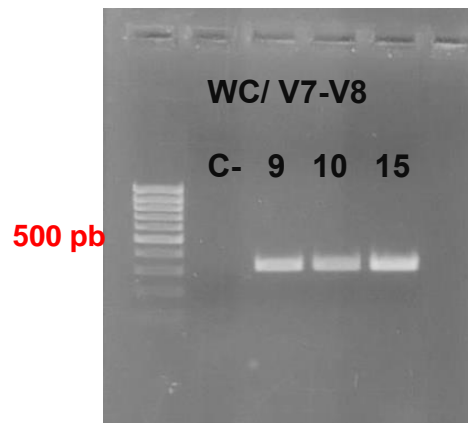


Figura 21. Amplicones de la reamplificación de bandas cortadas de DGGE paralelo (dónde se amplificó la región V7-V8) para su secuenciación. Gel de agarosa al 1.5%. Marcador MassRuler Low Range DNA Ladder, C-: control negativo, 9: muestra WC9, 10: muestra WC10 y 15: muestra WC15.

Las 11 muestras restantes presentaron electroferogramas con picos no definidos, de 5 de ellas, correspondientes a las muestras RC7, RC9, VC1, VC2 y VC7 se logró obtener una secuencia consenso realizando un análisis manual, en cada posición donde no se podía discernir entre una base u otra se determinó cuál de ambos picos era el más alto y mejor definido (el de la secuencia Directa o Inversa) y se tomó esa base como la correcta.

Electroferogramas con picos no definidos obtenidos con la técnica de DGGE se dan por problemas de comigración de bandas diferentes. Hao y colaboradores (2010) amplificaron la región V3 del gen ribosomal 16S de especies BAL de referencia y encontraron en perfiles de DGGE que bandas de diferentes cepas migraron a la misma distancia en el gel. Esto podría ser una posible explicación por lo cual hay dos secuencias en los electroferogramas, en otros casos, la gran proximidad entre bandas pudo haber sido problema en el momento de cortar la banda de interés y desde ahí en adelante se acarreó con ADN de secuencia diferente.

Para las 6 muestras de las que no fue posible obtener una secuencia consenso y para las 15 muestras restantes, se realizó la clonación del fragmento reamplificado para tener una muestra más limpia, que al secuenciar generara una única secuencia y así poder realizar la identificación.

8.9. Clonación

La clonación se utilizó como método de separación para resolver el problema de comigración de los fragmentos de ADN presentes en algunas muestras. El ADN obtenido de las bandas cortadas de DGGE fue reamplificado con los cebadores sin grapa (para la región V3, V4-V7 y *rpoB*) y ligado en el vector pJet1.2/blunt para posteriormente transformar las células competentes de *E.coli*. El plásmido tiene un gen letal que se interrumpe por el inserto, por lo cual, cualquier colonia desarrollada en el medio de selección asegura la presencia del plásmido recombinante. En total se utilizó el ADN extraído de 21 bandas de gel DGGE paralelo para clonación. Una vez que se incubaron las células transformantes para las 21 muestras, se obtuvieron

de 13 a 58 colonias pero únicamente se subcultivó 1 colonia de cada transformación para la extracción de plásmido y se llevó a cabo la digestión para linearizar las construcciones y confirmar el tamaño esperado.

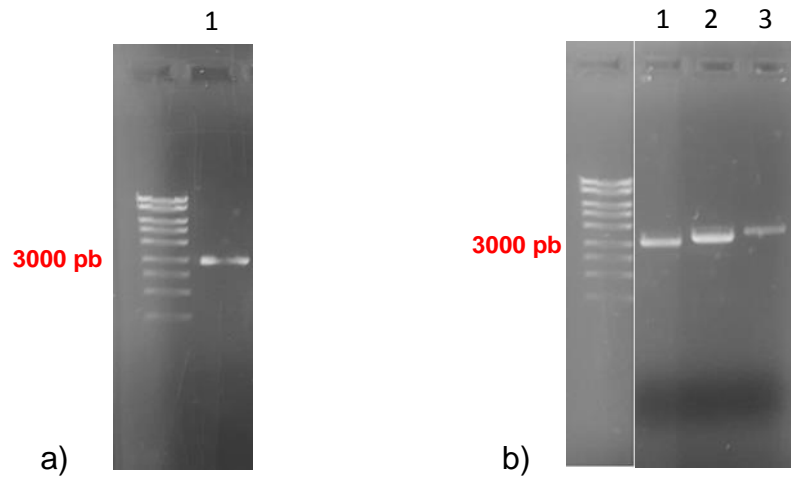


Figura 22. Digestión con enzima XhoI en gel de agarosa al 1%. Marcador 1kb DNA ladder, a) carril 1: plásmido vacío pJET1.2/blunt (2.97 kb) y b) Vector con diferentes insertos, carril 1: vector con inserto de región V3 (3.15 kb), carril2: vector con inserto de región *rpoB* (3.32 kb), carril 3: vector con inserto de región V4-V7 (3.67 kb).

En la figura 22, en el carril 1 del inciso a se muestra el plásmido vacío, la banda corresponde con el tamaño esperado (2974b). El inciso b es la imagen de la digestión de la construcción con tres diferentes insertos; en el carril 1 una muestra del plásmido más el inserto de la región V3 (3154 pb), en el carril 2 una muestra del plásmido más el inserto de la región *rpoB* (3324 pb) y en el carril 3 una muestra del plásmido más el inserto de la región V4-V7 (3674 pb), aunque los tamaños son muy similares se pueden observar las bandas escalonadas indicando el aumento de tamaño. Las tres construcciones se encuentran en el tamaño esperado. En total, para 21 muestras (4 para *rpoB*, 13 para V3 y 4 para V4-V7) se realizó la clonación, transformación, extracción de plásmido y finalmente la digestión (Figura 23).

En el carril 14 se observa una banda con un tamaño diferente al esperado, para esta muestra se repitió la digestión y se corroboró el tamaño.

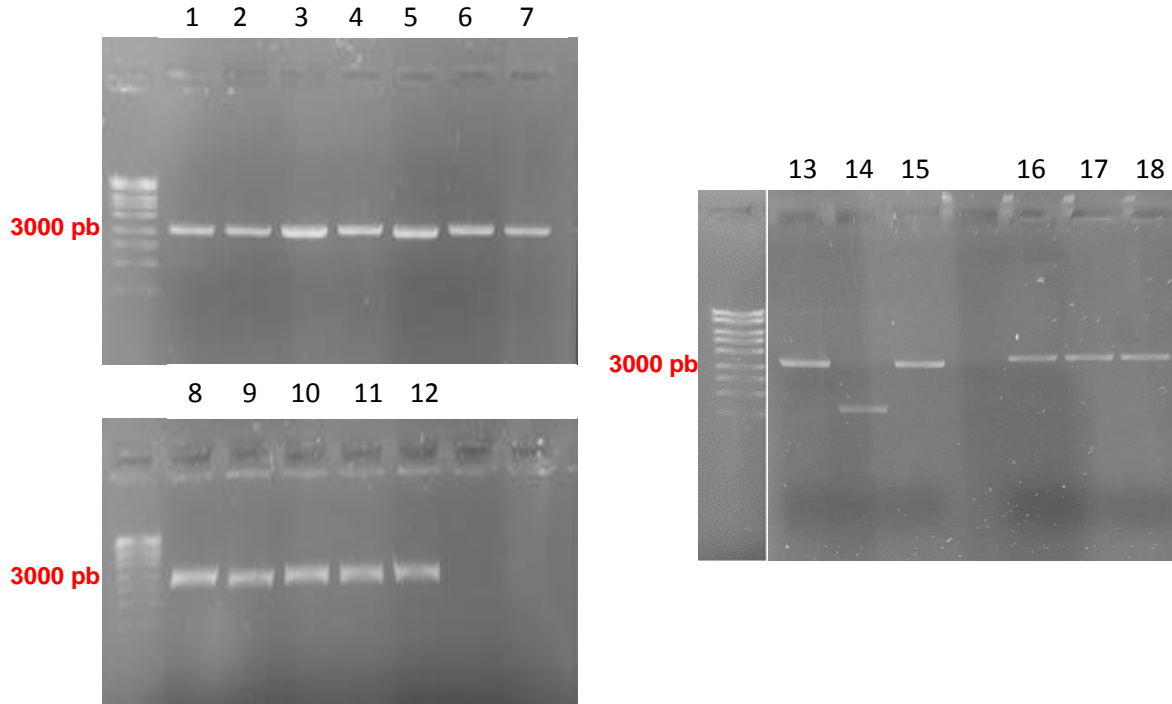


Figura 23. Digestión con enzima XhoI de las diferentes construcciones. Gel de agarosa al 1%. Marcador 1kb DNA ladder. Carriles 1-12: plásmido más región amplificada V3 (3.15 kb), carriles 13-15: plásmido más región amplificada *rpoB* (3.32 kb), carriles 16-18: plásmido más región amplificada V4-V7 (3.67 kb).

Las 21 construcciones se reamplificaron con los cebadores específicos sin grapa (338F/B518R, *rpoB*1698F/*rpoB*2041R y *Pedio2*:644/*FirR*:1244 según correspondía), se purificó el producto de PCR a partir de gel de agarosa siguiendo las instrucciones del proveedor (QIAEXII® Gel Extraction Kit de QIAGEN) y la concentración obtenida se ajustó a la necesaria para enviar a secuenciar a Macrogen en Corea.

8.10. Identificación de bacterias dominantes

En la Tabla 11 se muestran los resultados de la identificación de microorganismos (provenientes de una clona por cada muestra) mediante el análisis BLAST con la base de datos de NCBI, los cuales fueron consistentes con los obtenidos en el RDP

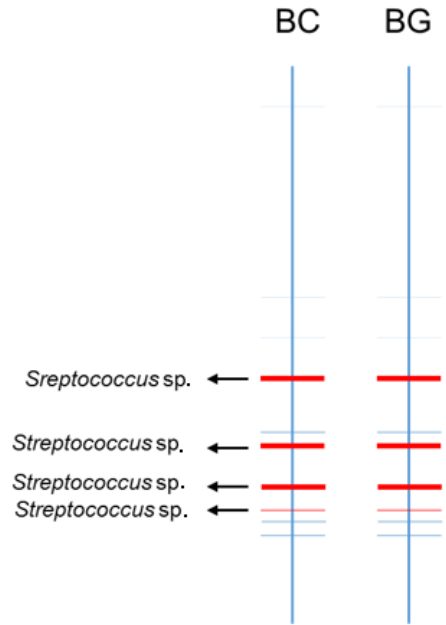
y en la Figura 24 se muestran los geles DGGE paralelo en la forma digital indicando las bandas seleccionadas para secuenciar con su respectiva identificación, en algunos casos se utiliza la nomenclatura sp. debido a que no fue posible la identificación a nivel especie.

Tabla 11. Identidad de las bandas seleccionados del patrón de bandeo en geles DGGE paralelo, mediante secuenciación y análisis BAST.

Banda	Región amplificada	Bacteria	Cobertura %	Identidad %	E
FC4	V4-V7	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i> / <i>Streptococcus thermophilus</i>	100	100	0.0
FC6	V4-V7	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i> / <i>Streptococcus thermophilus</i>	100	100	0.0
FC7	V4-V7	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i> / <i>Streptococcus thermophilus</i>	100	100	0.0
FC8	V4-V7	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i> / <i>Streptococcus thermophilus</i>	100	100	0.0
WC9	V7-V8	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i>	100	99.57	1e-119
WC10	V7-V8	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i>	100	99.11	2e-112
WC15	V7-V8	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i>	100	99.58	7e-122
RC3	rpoB	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	99	96.23	1e-133
RC7	rpoB	<i>Escherichia coli</i>	100	98.16	8e-73
RC9	rpoB	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	98.26	9e-78
RC11	rpoB	<i>Serratia marcescens</i>	100	100	4e-123
RG5	rpoB	<i>Lactococcus garvieae</i>	100	100	5e-137
RG10	rpoB	<i>Serratia marcescens</i>	100	93.5	2e-95
VC1	V3	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i>	100	100	1e-45
VC2	V3	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i>	100	100	2e-37
VC3	V3	<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	100	100	2e-49

VC4	V3	<i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Enterobacter hormaechei</i> / <i>Enterobacter asburiae</i>	100	100	6e-49
VC5	V3	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i> /	100	100	3e-52
VC6	V3	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i> /	100	100	3e-52
VC7	V3	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i> /	100	100	3e-42
VC8	V3	<i>Escherichia fergusonii</i> / <i>Escherichia coli</i> / <i>Escherichia albertii</i>	100	100	6e-49
VC9	V3	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i> /	100	98.95	8e-43
VC10	V3	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i> /	100	100	2e-44
VC11	V3	<i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Enterobacter hormaechei</i> / <i>Enterobacter asburiae</i>	100	100	6e-49
VC12	V3	<i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Enterobacter hormaechei</i> / <i>Enterobacter asburiae</i>	100	100	6e-49
VC13	V3	<i>Escherichia fergusonii</i> / <i>Escherichia coli</i> / <i>Escherichia albertii</i>	100	100	6e-49
VC14	V3	<i>Serratia ureilytica</i> / <i>Serratia nematodiphila</i> / <i>Serratia rubidaea</i>	100	100	6e-49
VC15	V3	<i>Streptococcus vestibularis</i> / <i>Streptococcus salivarius</i> /	100	100	3e-52
VC16	V3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	97.96	9e-31

A) V4-V7



B) V7-V8

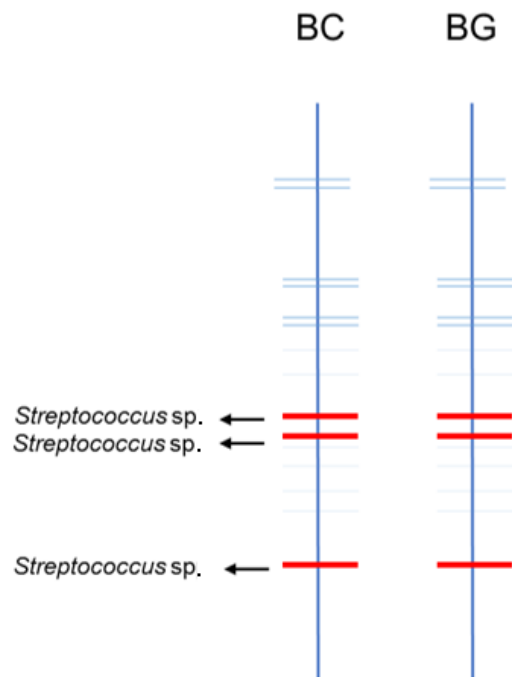


Figura 24. Identidad de microorganismos seleccionados del patrón de bandeo en DGGE paralelo. A) Región amplificada V4-V7, B) Región amplificada V7-V8, C) Región amplificada *rpoB*, D) Región amplificada V3.

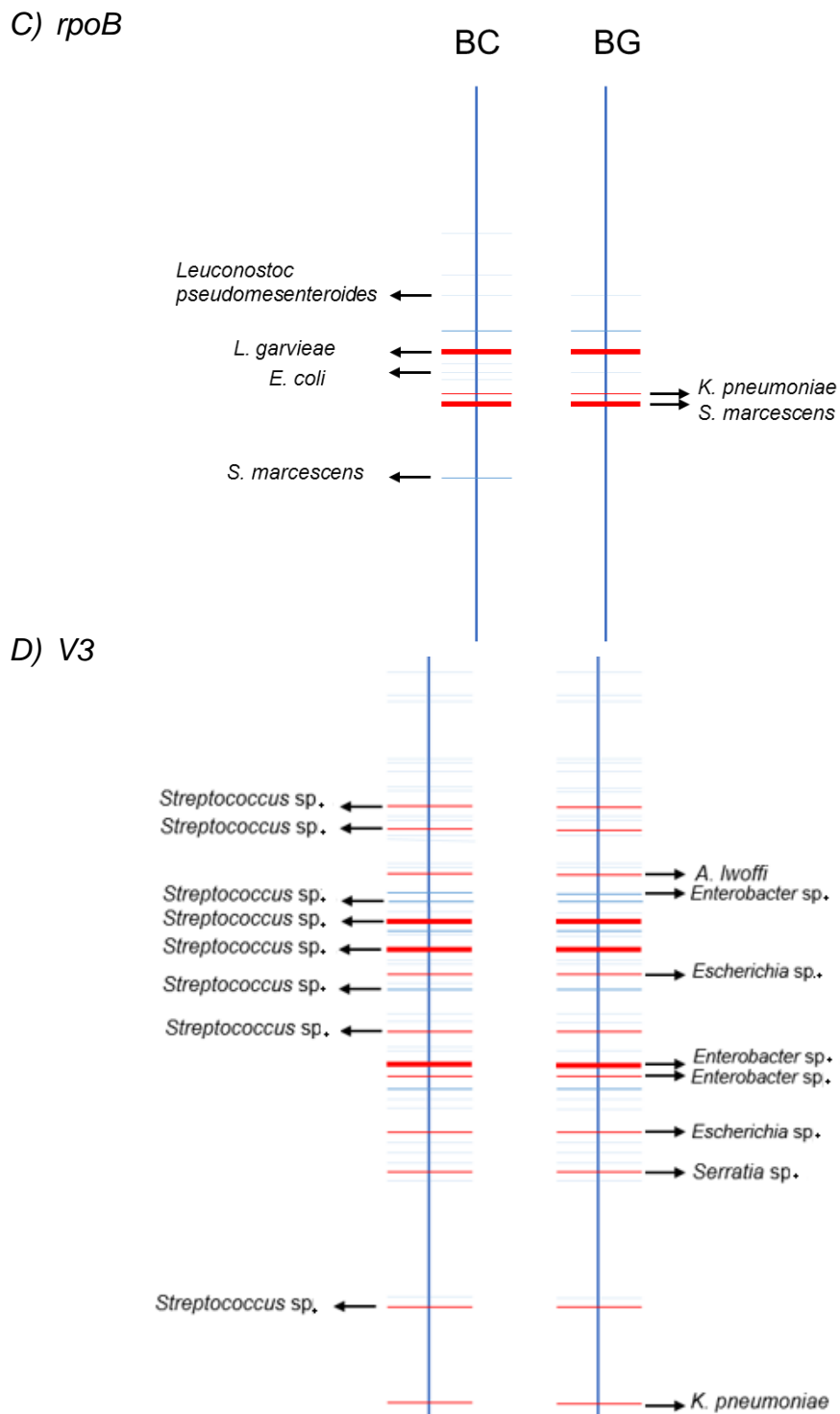


Figura 24 continuación. Figura 24. Identidad de microorganismos seleccionados del patrón de bandeado en DGGE paralelo. A) Región amplificada V4-V7, B) Región amplificada V7-V8, C) Región amplificada *rpoB*, D) Región amplificada V3.

Las cuatro muestras secuenciadas de esta región permitieron realizar un análisis comparativo utilizando la base de datos BLAST. Las cuatro secuencias alinearon con el gen 16S de las especies *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus thermophilus* con un porcentaje de cobertura del 100% mientras que los porcentajes de identidad en todos los casos fueron del 100%.

Para las bacterias identificadas por el ADNr 16S, la mayoría de los taxonomistas aceptan un porcentaje de identidad $\geq 97\%$ y $\geq 99\%$ para clasificar un microorganismo por género y especie, respectivamente (Petti, 2007), sin embargo, estos valores son utilizados como referencia al emplear todo el gen ribosomal el cual abarca aproximadamente 1500 pb, las muestras analizadas corresponden a fragmentos de aproximadamente 600 pb, un tamaño pequeño para poder hacer una comparación; lo mismo ocurre con los fragmentos V7-V8 y V3 con fragmentos de entre 120 y 300 pb.

Las bandas seleccionadas con esta región fueron las que resultaron dominantes en el perfil de bandeo con DGGE y las cuatro se identificaron con el mismo género: *Streptococcus*. Con esta región no fue posible diferenciar entre las especies *S. vestibularis*, *S. salivarius* y *S. thermophilus*, el análisis BLAST arrojó las tres especies con un porcentaje de identidad del 100%. Con esta identificación, se descartó la presencia tentativa de *Lactiplantibacillus plantarum* planteada con los patrones de bandeo obtenidos en el gel DGGE paralelo.

Para complementar la identificación se elaboraron análisis de agrupación comparando las secuencias muestra contra algunas secuencias de referencia. Todas las secuencias se alinearon y se delimitaron a la región V4-V7, el árbol consenso obtenido fue poco robusto (por lo cual no se presenta) ya que efectivamente esta región no permitió diferenciar entre las especies *vestibularis*, *salivarius* y *thermophilus*, esto es posible observarlo en la Figura 25 inciso A, donde se muestran aproximadamente 100 pb del fragmento V4-V7 y sólo es posible observar bases que permiten diferenciar a *S. infantis* y *K. pneumoniae*, las demás secuencias son totalmente similares, situación que ocurre a lo largo de todo el fragmento V4-V7.

❖ Región amplificada **V7-V8** del gen ribosomal 16S

El análisis de BLAST de las tres secuencias correspondientes a la región V7-V8, alinearon con el gen 16S de especies *Streptococcus vestibularius* y *Streptococcus salivarium*, con porcentajes de cobertura del 100% y porcentajes de identidad mayores al 99%.

Las bandas seleccionadas con esta región fueron las que resultaron dominantes en el perfil de bandeo de DGGE y las tres se identificaron con el mismo género: *Streptococcus*. Con esta región no fue posible diferenciar entre las especies *vestibularis* y *salivarius*, ambas con porcentaje igual de identidad. Con esta identificación, también se descartó la presencia tentativa de *Lactiplantibacillus plantarum* planteada con los patrones de bandeo obtenidos en el gel DGGE paralelo.

Al realizar el análisis de agrupación (con las mismas secuencias de referencia que se utilizaron con la región V4-V7), el árbol consenso obtenido también fue poco robusto (por lo que no es mostrado) ya que como se observó con el BLAST esta región no permite diferenciar entre las especies *S. vestibularis* y *S. salivarius*, pero sí permite diferenciar éstas de *S. thermophilus*.

En la Figura 25 inciso B se muestran aproximadamente 100 pb del fragmento V7-V8, la muestra WC10 tiene únicamente una base diferente (marcada con una flecha negra) a las secuencias de las muestras WC9 y WC15, las secuencias de las tres muestras son iguales a las secuencias de *S. salivarius* y *S. vestibularis*. En todo el fragmento existe una base (marcada con flecha amarilla) que permite diferenciar a *S. thermophilus* y hay un mayor número de bases para diferenciar a *S. infantis* y *K. pneumoniae*

❖ Región amplificada **V3** del gen ribosomal 16S

Al amplificar la región V3 se seleccionaron 16 bandas para ser clonadas y secuenciadas. El análisis de BLAST de las secuencias permitió identificar secuencias homólogas que en todos los casos mostraron un porcentaje de cobertura del 100% y un porcentaje de identidad del 100% a excepción de las muestras VC9 con 98.95% y VC16 con 97.96%.

Las muestras VC1, VC2, VC5, VC6, VC7, VC9, VC10 y VC15 se lograron identificar como correspondientes a bacterias del género *Streptococcus* sin la posibilidad de identificar entre las especies *S. vestibularius* y *S. salivarius*, con las que se obtuvo el mismo porcentaje de identidad.

Las muestras VC4, VC11 y VC12 se identificaron como bacterias del género *Enterobacter* sin poder identificar entre las especies *E. cloacae*, *E. hormaechei* y *E. asburiae* obteniendo un porcentaje igual de identidad en los tres casos.

Para las muestras VC8 y VC13 la identificación fue de bacterias del género *Escherichia* pudiendo ser la especie correspondiente *E. fergusonii*, *E. coli* o *E. albertii*.

Por su parte, la secuencia de la muestra VC14 fue identificada como *Serratia* con un porcentaje igual de identidad entre las especies *S. ureilytica*, *S. nematodiphila* y *S. rubidaea*.

Únicamente para las muestras VC3 y VC16 fue posible hacer una identificación hasta nivel especie, estas muestras corresponden a *Acinetobacter lwoffii* y *Klebsiella pneumoniae*.

Las muestras VC4 (identificada como *Enterobacter*), VC5 y VC9 (identificadas como *Streptococcus*) corresponden a bandas no dominantes con este fragmento amplificado.

El análisis de agrupamiento para la región V3 se separó en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Al igual que con las regiones anteriores, al analizar las bacterias Gram positivas identificadas se obtiene un árbol poco robusto (no mostrado). En la

Figura 25 inciso C se muestran las secuencias para esta región, se observó que entre muestras, VC9 tiene una base diferente (marcada con flecha negra). Las secuencias de las muestras son iguales a *S. salivarius* y *vestibularis*, sólo hay una base que permite diferenciar a *S. thermophilus* (marcada con una flecha amarilla) y hay mayor cantidad de bases para diferenciar a *S. infantis* y *K. penumoniae*.

Al realizar el análisis de agrupamiento para las bacterias Gram negativas se encontró que una parte del árbol es poco robusto (no mostrado), por lo que solo se presenta la parte que sirvió para evidenciar la correcta identificación de la muestra VC3 como *Acinetobacter lwoffii* agrupándola con cepas de la misma especie y separándola de cepas cercanamente relacionadas de la especie *pseudolwoffii* (Figura 26).

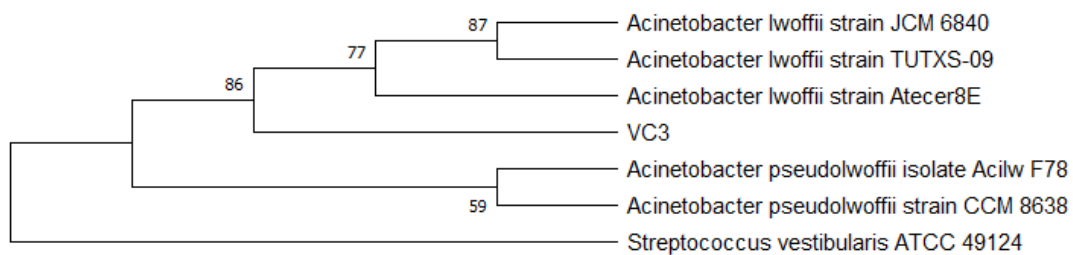


Figura 26. Árbol de agrupación para *Acinetobacter lwoffii* (árbol consenso) utilizando la región V3 del gen ribosomal 16S. Se utilizó *S. vestibularis* como referencia externa para representar una secuencia diferente a las bacterias Gram negativas.

La otra parte del árbol de agrupación al ser poco robusto no permitió diferenciar entre las distintas especies posibles de *Serratia*, misma situación pasa con *Escherichia* y *Enterobacter* debido a la similitud total de las secuencias en este fragmento. En la figura 27 se observa que la muestra VC14 identificada mediante BLAST como *Serratia* tiene la misma secuencia que las referencias de este género, al igual que las muestras VC13 y VC8 con *Escherichia* y las muestras VC4, VC11 y VC2 con *Enterobacter*.

La muestra VC16 fue identificada mediante BLAST como *K. pneumoniae*, en este punto es importante recordar que la muestra VC16 tiene el porcentaje más bajo de identidad mediante BLAST para todas las muestras de esta región por lo que su identificación no es precisa.

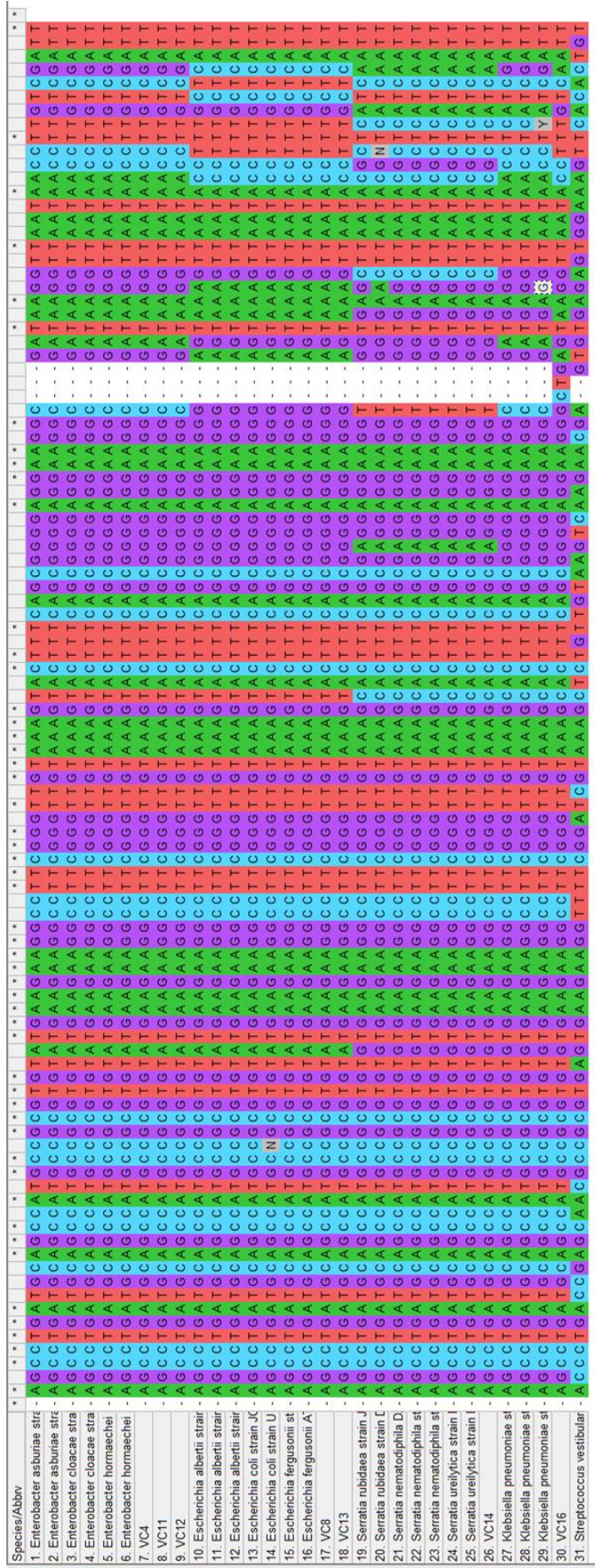


Figura 27. Alineamientos de secuencias de la región V3 de muestras y secuencias de referencia Gram negativas. Se utilizó *S. vestibularis* como referencia externa para representar una secuencia diferente a las bacterias Gram negativas

❖ Región amplificada del gen *rpoB*

Con el análisis de la secuencia del gen *rpoB* todas las muestras tuvieron un porcentaje de cobertura del 100% a excepción de una cuyo porcentaje fue 99%, los porcentajes de identidad para estas muestras variaron del 93.5% al 100%. Utilizando el gen *rpoB* el porcentaje de identidad para definir género es $\geq 85.5\%$ y para definir especie depende del tamaño amplificado, en este caso el tamaño de fragmento es de aproximadamente 300 pb el cual entra en el rango 300-600 pb para el cual se requiere $\geq 94\%$ de identidad (Bou *et al.*, 2011). Tomando como referencia estos valores, la muestra RG10 no pudo ser identificada con precisión a nivel especie y esto se puede deber a la falta de información sobre la secuencia de este gen en diferentes microorganismos en la base de datos de GenBank utilizada en ese momento, ya que se sabe que el gen *rpoB* no tiene una base de datos tan completa como la del ADNr16S (Adékambi *et al.*, 2009); sin embargo, este problema se podría resolver gradualmente con una mayor cantidad de especies secuenciadas.

Con los amplicones de *rpoB* se seleccionaron seis bandas para secuenciación: tres de ellas corresponden a bandas dominantes (RG5, RG10 y RC9) que se identificaron como *Lactococcus garvieae*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella pneumoniae*, y tres más que representan a bacterias no dominantes (RC3, RC7 y RC11) correspondientes a *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*.

A diferencia de las regiones amplificadas del gen ribosomal 16S, con *rpoB* se lograron realizar árboles de agrupamiento suficientemente robustos. Se realizaron dos árboles, uno correspondiente a las bacterias Gram positivas y otro a las bacterias Gram negativas.

La Figura 28 corresponde al árbol con las muestras correspondientes a bacterias Gram positivas. Fue posible observar la agrupación de la muestra RC3 en el grupo de *Leuconostoc mesenteroides*, así como la agrupación de la muestra RG5 en el grupo de *Lactococcus garvieae*. En ambos casos coincide con la identificación obtenida mediante BLAST.

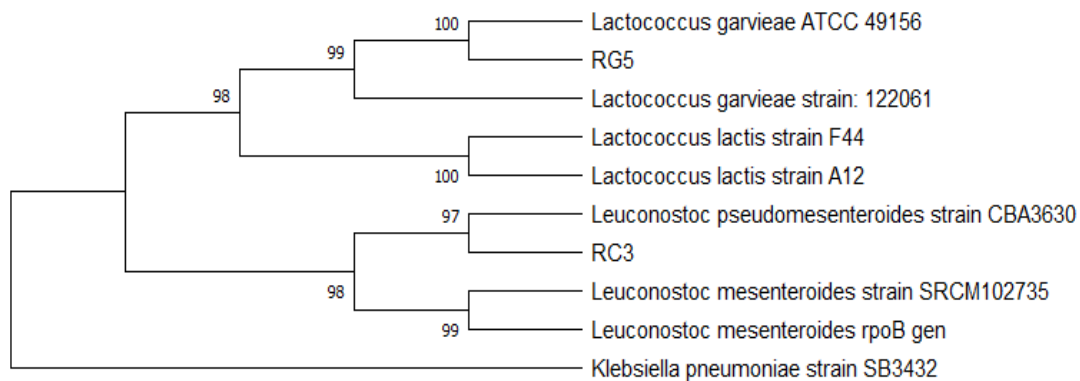


Figura 28. Relación filogenética de las cepas identificadas como bacterias Gram positivas (árbol consenso) utilizando un fragmento del gen *rpoB*. Se utilizó *K. pneumoniae* como referencia externa para representar una secuencia diferente a las bacterias Gram positivas.

La Figura 29 corresponde al árbol con las muestras correspondientes a bacterias Gram negativas. Las muestras RC11 y RG10 fueron identificadas como *Serratia marcescens* mediante BLAST y aunque la muestra RG10 tuvo un porcentaje bajo de identidad, ambas fueron agrupadas con las cepas de referencia para esta especie. La secuencia RC7 fue agrupada con la especie *Escherichia coli* y RC9 agrupada con *Klebsiella pneumoniae*, esto es consistente con la identificación por BLAST para estas muestras.

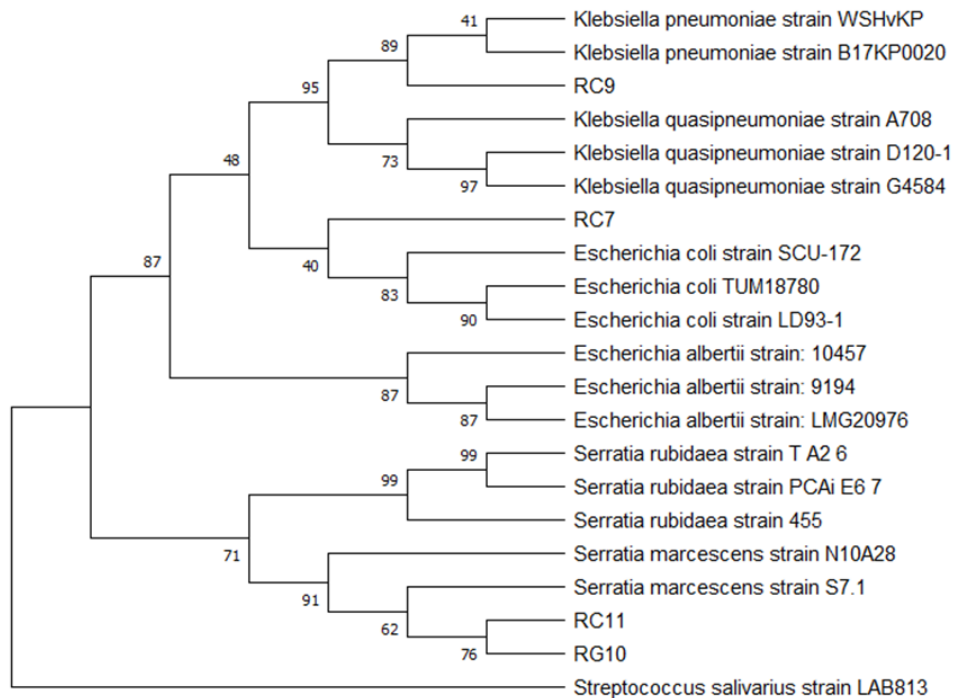


Figura 29. Relación filogenética de las cepas identificadas como bacterias Gram negativas (árbol consenso) utilizando un fragmento del gen *rpoB*. Se utilizó *S. salivarius* como referencia externa para representar una secuencia diferente a las bacterias Gram negativas.

❖ Comparación ADN_r 16S vs *rpoB*

Al comparar los resultados obtenidos para la amplificación de *rpoB*, **V4-V7**, **V7-V8** y **V3** se observó que con *rpoB* fue posible realizar una identificación hasta nivel de especie en todas las muestras, con **V3** únicamente en dos de las dieciséis muestras se logró la identificación a nivel especie, mientras que con **V4-V7** y **V7-V8** ninguna muestra se pudo identificar hasta especie. Esto concuerda con el reporte de que la secuenciación del ADN_r 16S es útil para representar las relaciones de cepas bacterianas de manera confiable a nivel de género, pero solo podría descifrar moderadamente entre las relaciones a nivel de especie (Adékambi *et al.*, 2009).

Yu & Morrison en el año 2004 utilizaron un conjunto filogenéticamente representativo de 218 genes 16S que se descargó de la base de datos RDP,

algunas regiones hipervariables V se delimitaron por las secuencias de cebadores que las flanquean y se obtuvo la identidad de las secuencias. Encontraron que la región V1 es la más variable, seguida por las regiones V9 y V3. Con esto es posible explicar porque al utilizar la región **V3** se proporciona mayor información sobre la diversidad de la comunidad bacteriana presente en el queso, en comparación con las otras regiones utilizadas del gen ribosomal 16S (**V7-V8** y **V4-V7**) con las cuales hubo un menor número de bandas y solo se logró identificar la especie *Streptococcus*. En general, las tres regiones amplificadas del ADNr 16S no permitieron diferenciar entre especies relacionadas cercanas lo que resultó en árboles de agrupamiento poco robustos.

Existen artificios introducidos durante la técnica PCR-DGGE que pueden estar relacionados a la aparición de múltiples bandas provenientes de aislados únicos, lo que conduce a resultados sesgados (Neilson *et al.*, 2013), la formación de estos artificios podría ser la causa de que en este proyecto, al utilizar el ADNr 16S la identificación de varias bandas resulte en un mismo microorganismo, sin embargo, este fenómeno lo asociamos principalmente al número de copias de este gen y su heterogeneidad. Copias múltiples del ADNr 16S y la heterogeneidad de secuencias entre estas copias complica la interpretación de la riqueza de la comunidad bacteriana en los perfiles de bandeo de DGGE ya que múltiples bandas pueden resultar en una sola especie. Se ha reportado que sólo una minoría de genomas bacterianos alberga copias idénticas del ADNr 16S y la diversidad de secuencias aumenta con el número creciente de copias, este número por genoma varían de 1 a 15 o más. Al analizar 7,081 secuencias de ADNr 16S que se extrajeron *in silico* de 1,690 genomas bacterianos disponibles se encontró que el número de copias de este gen por genoma fue especialmente alto en Firmicutes y Gammaproteobacterias, con promedios por genoma de más de cinco copias (a estos grupos pertenecen *Streptococcus* y *Enterobacter*, *Escherichia* respectivamente y cuya identidad se encontró en más de una banda en los geles de DGGE). Además de mostrar un alto número de copias del gen, Firmicutes y Gammaproteobacteria mostraron una alta variabilidad del ADNr 16S dentro del genoma (Větrovský & Baldrian, 2013).

Caso contrario ocurre cuando se amplifica el gen *rpoB* el cual existe como una copia única en genomas bacterianos. Se ha demostrado que bacterias de aislamientos ambientales identificadas utilizando los genes *rpoB* amplificados por PCR producen bandas únicas en geles DGGE (Dahllöf *et al.*, 2000). En este trabajo en la identificación de bacterias en queso amplificando una región del gen *rpoB* no se encontró el conflicto de que diferentes bandas dieran un mismo microorganismo con excepción de las bandas RC11 y RG10 y en cuyo caso la banda RG10 por su bajo porcentaje de identidad tiene una identificación dudosa.

En la Tabla 3 localizada en el apartado de antecedentes se muestran las bacterias encontradas en queso Cotija con los cuatro diferentes pares de cebadores utilizados en este proyecto, con cada región amplificada se pudieron identificar diferentes géneros, esto se puede deber a que las muestras de queso Cotija fueron diferentes en cada análisis existiendo alguna(s) variación(es) en cuanto a materia prima utilizada, proceso de elaboración y/o condiciones de elaboración con lo cual la comunidad bacteriana presente en cada muestra sería variable. En el caso del queso bola de Ocosingo se analizó la misma muestra con todos los cebadores, razón por la cual las bacterias dominantes identificadas con cada región se mantienen constantes.

Yunita & Dood (2017) realizaron el análisis de la comunidad microbiana presente en un queso de vena azul elaborado con leche cruda en el Reino Unido utilizando 3 pares de cebadores amplificando las regiones V3, V4-V5 y V6-V8 del gen ribosomal 16S; con cada región pudieron identificar diferentes especies y algunas compartidas. Estos resultados son opuestos a los encontrados con queso bola de Ocosingo ya que en este caso utilizar 3 cebadores para diferentes regiones del ADNr 16S no aporta una visión más completa de la comunidad bacteriana dominante, y esto se puede deber a que los cebadores utilizados para queso bola y los utilizados por Yunita & Dood amplifican regiones diferentes.

Al comparar entre los géneros encontrados utilizando como secuencia diana el ADNr **16S** y *rpoB* en geles de DGGE de diferentes matrices en la literatura, se ha observado que generalmente cuando se usa *rpoB* hay un menor número de bandas

por carril, pero se encuentran diferentes géneros que al usar ADNr 16S (Dahllof *et al.*, 2000, Martin-Platero *et al.*, 2009, Renouf *et al.*, 2006, Casillas Hernández, 2013), esta situación ocurre en queso bola de Ocosingo ya que al amplificar *rpoB* no se encontró el género *Streptococcus*, el cual fue identificado amplificando las diferentes regiones de ADNr 16S.

En el año 2011, Perumbakkam y colaboradores evaluaron mediante PCR-DGGE la población bacteriana de rumen bovino y ovino amplificando la región V3 del ADNr 16S y un fragmento de *rpoB* (utilizando para *rpoB* los mismos cebadores empleados en este proyecto), al igual que los resultados aquí obtenidos, con la amplificación de V3 obtuvieron mayor número de bandas; también encontraron que el porcentaje de bacterias asociadas con el filo Proteobacteria fueron más predominantes en la muestra amplificada con los cebadores para *rpoB* con el 24%, en comparación con los cebadores para V3 en cuyo caso las Proteobacterias solo representaron el 3%. Caso similar ocurrió en queso bola de Ocosingo, ya que al utilizar los cebadores para amplificar un fragmento de *rpoB* se encontró mayor cantidad de Proteobacterias comparando con 16S.

En queso bola, *Streptococcus* sp. fue identificado secuenciando fragmentos del ADNr 16S pero no al secuenciar un fragmento de *rpoB*. Con respecto a la no amplificación de este gen para algunas especies bacterianas, se ha mencionado que la mayor desventaja al usar *rpoB* reside en el hecho de que es difícil diseñar cebadores universales, al contrario que con el ADNr 16S, la principal limitación para el desarrollo de cebadores de *rpoB* (u otro gen housekeeping) es el uso de codones y la sustitución de nucleótidos (Deperrois-Lafarge & Meheut, 2012; Case *et al.*, 2007).

Los cebadores para *rpoB* utilizados en este proyecto fueron diseñados a partir de las secuencias de *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, y *H. pylori* (Dahllof *et al.*, 2000), no se ha utilizado este gen para la evaluación de comunidad bacteriana en alimentos fermentados por lo que convendría realizar un análisis *in vitro* utilizando bacterias ácido lácticas como referencia para el diseño de nuevos cebadores con mayor afinidad hacia este grupo de bacterias.

La selección de cebadores universales para amplificar ADNr 16S y *rpoB* de una amplia gama de bacterias sigue siendo una tarea desalentadora, parece imposible diseñar un par de cebadores que pueda amplificar el gen de todas las bacterias conocidas (Khayaletu, 2013). De acuerdo con los resultados obtenidos, para el análisis de bacterias dominantes presentes en queso bola de Ocosingo se recomienda el uso de dos pares de cebadores **338F/B518R** y **rpoB1698F/rpoB2041R** (que amplifican la región **V3** del ADNr 16S y un fragmento del gen *rpoB* respectivamente).

8.11. Géneros encontrados en queso bola de Ocosingo

Con las veintinueve bandas seleccionadas de los perfiles de DGGE y para los cuatro diferentes pares de cebadores se pudieron identificar en total ocho diferentes géneros de bacterias.

BACTERIAS GRAM POSITIVAS

Streptococcus, *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Lactococcus garviae* son microorganismos que pertenecen al orden Lactobacillales. Los Lactobacillales o BAL son un orden de bacterias Gram positivas, tolerantes a los ácidos, generalmente no esporulantes, que comparten características metabólicas y fisiológicas comunes. Estas bacterias generalmente se encuentran en productos lácteos y producen ácido láctico como el producto metabólico de la fermentación de carbohidratos (Lorenzo *et al.*, 2018).

❖ *Streptococcus*

El grupo salivarius de Streptococci consiste de tres especies genéticamente similares, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus vestibularius* y *Streptococcus*

thermophilus. De estas tres especies *S. thermophilus* así como *S. salivarius* son bacterias presentes regularmente en productos lácteos.

S. salivarius y *S. vestibularis* son organismos comensales que ocasionalmente pueden causar infecciones oportunistas en humanos. *S. salivarius* es el colonizador primario y predominante de la superficie de la mucosa oral en humanos, no inicia infecciones en individuos sanos y muestra una virulencia pobre (Delorme *et al.*, 2015). Dentro de esta especie, algunas cepas como la K12 se han convertido en cepas de *S. salivarius* desarrolladas comercialmente como probióticos (Zupancic *et al.*, 2017).

S. salivarius es considerada como BAL iniciadora empelada en productos lácteos fermentados. La presencia de *S. salivarius* ha sido reportada en leche cruda de camello y productos lácteos fermentados de África (Jans *et al.*, 2017), en leche fermentada colombiana (Motato *et al.*, 2017) y en quesos como el Salers en Francia (Callon, *et al.*, 2004).

❖ *Leuconostoc pseudomesenteroides*

Leuconostoc sp. son organismos ambientales que generalmente se encuentran en plantas frescas, desde este hábitat natural se diseminan a varios nichos incluyendo leche cruda. Desempeñan un papel importante en varios procesos de fermentación industrial y alimentaria como salchichas fermentadas, vegetales fermentados y productos lácteos; en la tecnología láctea, *Leuconostoc* está naturalmente presentes en numerosas variedades de queso, en particular en los quesos de leche cruda (Ogier *et al.*, 2008).

La bacteria ácido láctica no iniciadora *Leuconostoc pseudomesenteroides* juega un papel clave en la formación de compuestos aromáticos y ha sido aislada de diferentes productos como leche pasteurizada y queso cremoso argentino (D'Angelo *et al.*, 2017), queso Pico (Ca'mara *et al.*, 2019), queso Jben marroquí (Ouadghiri *et al.*, 2005) y en otros productos no lácteos como en frutas fermentadas en Taiwan (Chen *et al.*, 2020).

En los resultados mostrados por Duan y colaboradores (2008) la mayoría de grupos de BAL aislados de queso Qula fueron pertenecientes al género *Leuconostoc* (78%) entre ellos la especie *pseudomesenteroides* (este queso es elaborado en el Tibet y se elabora agregando yogurt a la leche de yak). De igual manera, en quesos de leche mixta (cabra y vaca) se realizó el análisis de bacterias presentes, las BAL fueron las dominantes y *Leuconostoc pseudomesenteroides* fue el segundo grupo más dominante, se mostró la presencia de este microorganismo en los quesos desde el día 15 de maduración hasta el producto final (Campos *et al.*, 2011).

❖ *Lactococcus garvieae*

Los lactococos se encuentran generalmente en plantas y piel de animales y su papel principal en la fermentación láctea es la acidificación (Casalta & Montel, 2008).

Lactococcus garvieae es considerado un patógeno de diferentes especies de peces silvestres y de cultivo, también se ha podido aislar de algunos animales terrestres, y de ríos y aguas residuales. Sin embargo, no es una especie rara de encontrar en el queso ya que en los últimos años varios autores han reportados a *L. garvieae* como un componente de la microbiota natural de leche cruda de vaca, cabra, oveja y yegua (Gibello *et al.*, 2016). En otros estudios se demostró que esta especie representa un componente relevante de la población microbiana de dos quesos italianos artesanales (Fortina *et al.* 2003; Foschino *et al.* 2006). Del mismo modo, otros autores encontraron a *L. garvieae* como parte de la población bacteriana autóctona en diferentes quesos griegos (Fortina *et al.*, 2007). Por lo tanto, esta especie parece estar asociada a menudo con productos lácteos fermentados.

En un experimento, se estudiaron cepas de *L. garvieae* aisladas de peces y cepas aisladas de productos lácteos y se encontró que las cepas de origen lácteo tienen una capacidad mínima de acidificar utilizando la lactosa y poca incidencia de factores de virulencia; mientras que las cepas aisladas de peces no tienen actividad acidificante y tienen varios factores de virulencia. No se han registrado informes sobre la asociación entre el consumo de queso de leche cruda y las infecciones por *L. garvieae* en humanos. En contraste, en los últimos años, se han reportado varias bacteriocinas producidas por *L. garvieae*. La bacteriocina garvicina KS (GarKS)

producida por una cepa de *L. garvieae* aislada de leche cruda ha mostrado inhibir importantes bacterias patógenas pertenecientes a los generos *Staphylococcus*, *Listeria* y *Enterococcus* (Abdelfatah *et al.*, 2018).

BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Otro grupo muy importante de bacterias que se pudieron identificar en el queso bola de Ocosingo son las pertenecientes a las enterobacterias: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* y *Enterobacter* sp.

Aunque las Enterobacteriaceae son reconocidas como parte de la microbiota natural de la leche pueden estar relacionadas con la contaminación de origen fecal y, por lo tanto, se consideran un indicador de una mala práctica de higiene durante la ordeña y la fabricación de queso (Tabla *et al.*, 2018); sin embargo, una amplia variedad de géneros y especies de la familia Enterobacteriaceae se han encontrado en leche y otros productos (Martins *et al.*, 2018).

❖ *Serratia*

Las especies de *Serratia* son bacterias Gram negativas, hasta la fecha 20 diferentes especies de *Serratia* han sido descritas. En particular, *Serratia marcescens* es una bacteria ambiental ubicua capaz de causar infecciones oportunistas en humanos y muchas especies animales incluyendo mastitis en vacas lecheras. Este microorganismo se ha aislado de agua, suelo, diferentes tipos de plantas e insectos, el entorno de las granjas como salas de ordeña y de las heces de las vacas lecheras (Friman *et al.*, 2019). Se ha descubierto que *Serratia marcescens* aislada de leche cruda produce lipasa extracelular por lo que el crecimiento de este microorganismo podría contribuir a defectos de sabor en la leche y los productos lácteos (Abdou, 2003). Se ha reportado la presencia de *Serratia* en queso Paipa en Colombia (Castellanos-Rozo *et al.*, 2020), en varios quesos de diferentes regiones de Francia (Coton *et al.*, 2012) y fue la especie más dominante de enterobacterias en leche destinada a la producción de queso Grana Padano en Italia (Decimo *et al.*, 2014)

❖ *Escherichia*

Dentro del género *Escherichia*, las especies *E. coli*, *E. albertii* y *E. fergusonii* son bacterias cercanamente relacionadas que pueden causar enfermedad en humanos (Lindsey *et al.*, 2017). En especial *Escherichia coli* es una de las bacterias más importantes que tiene un efecto negativo tanto en especies humanas como animales. *E. coli* es un habitante normal del intestino grueso en humanos y animales de sangre caliente. La principal fuente de *E. coli* en la leche cruda y los productos lácteos es la contaminación fecal durante el proceso de ordeño junto con las malas prácticas de higiene, por lo tanto, *E. coli* se usa generalmente como un indicador confiable de contaminación fecal directa o indirecta en estos productos (Kornaki & Johnson, 2001). A pesar del efecto negativo de esta bacteria, se ha aislado en México de queso fresco y queso Chihuahua (De la Rosa-Hernandez *et al.*, 2018; Torres-Vitela *et al.*, 2012; Renye *et al.*, 2011), en quesos egipcios (Hussien *et al.*, 2019) y queso mozzarella en Brasil (Maia *et al.*, 2019).

❖ *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es un patógeno oportunista, habita una amplia gama de nichos ambientales, es un colonizador de ganado (es una causa importante de mastitis en vacas lecheras), un contaminante de carnes y verduras, y causa infecciones en humanos y animales donde puede distribuirse ampliamente en las vías respiratorias e intestinales, estas infecciones se están volviendo rápidamente intratables debido a la aparición de cepas multirresistentes (MDR) (Yang *et al.*, 2019). *K. pneumoniae* fue aislada en el 100% de muestras de leche de búfalo con evidencia de mastitis subclínica y en el 10% de las muestras de leche de búfalos aparentemente sanos (Bandyopadhyay *et al.*, 2018). Los alimentos, el agua y las heces son fuentes de exposición a *K. pneumoniae* en las granjas ganaderas, además de que se ha aislado de los tanques de leche. Estos hallazgos destacan las posibles vías para que *K. pneumoniae* presente en las granjas lecheras entre en contacto con la leche y su consecuente presencia en quesos (Davis & Price, 2016).

Se sabe poco sobre la relación entre los aislamientos de *K. pneumoniae* de bovinos y humanos a nivel del genoma, en el año 2019 Yang y colaboradores compararon

cepas aisladas de humanos y vacas lecheras encontrando que los aislados de humanos tienen más genes de virulencia que los aislados de bovinos, esto puede sugerir que las cepas de *K. pneummoniae* encontradas en productos lácteos que podrían ser provenientes de contaminación bovina son menos dañinas, sin embargo, se necesitan más estudios para establecer la inocuidad de cepas aisladas de quesos en general.

Algunos productos donde se ha aislado este tipo de bacterias son queso Mozzarella y queso tradicional portugués elaborado con leche cruda de vaca (Massa *et al.*, 1992; Kongo *et al.*, 2008).

❖ *Enterobacter*

Un género representativo de coliformes ubicuos es *Enterobacter* que incluye varias especies que se pueden encontrar en muchos entornos conocidos como la leche y el queso. Aunque *Enterobacter* sp. normalmente se aísla de la leche cruda y pasteurizada y mantequilla, no se considera que pueda afectar sensorialmente a los lácteos. Diferentes géneros pertenecientes a esta especie se han aislado como parte de la microbiota presente en leche cruda fría (Martins *et al.*, 2018), leche entera para la elaboración de queso Grana Trentino (Franciosi *et al.*, 2011) y en diferentes tipos de queso. Trmčić y colaboradores (2016) realizaron el análisis de 273 muestras de queso en Nueva York (que incluyen quesos elaborados con leche cruda y con leche pasteurizada) en búsqueda de coliformes; *Serratia* representó uno de los tres géneros aislados con mayor frecuencia en todos los quesos, mientras que *Enterobacter* fue significativamente más común entre los quesos de leche cruda.

❖ *Acinetobacter lwoffii*

Otra bacteria aislada del queso bola de Ocosingo fue *Acinetobacter lwoffii* el cual es un conocido colonizador de la piel, y es conocido por ser una bacteria ubicua que ha sido aislada de diferentes ambientes. En alimentos *Acinetobacter* se detecta con frecuencia en muestras de leche cruda fría para la fabricación de quesos. Las cepas que pertenecen a este género pueden producir enzimas que podrían conducir al

deterioro de la leche, principalmente lipasas (Machado *et al.*, 2017). *Acinetobacter* se ha aislado de leche entera y desnatada para fabricación de queso Grana Trentino (Franciosi *et al.*, 2011), leche cruda fresca de diferentes países (Machado *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2018) y en queso Mozzarella de alta humedad se encontró como el segundo género más representativo de bacterias no ácido lácticas (Baruzzi *et al.*, 2012).

8.12. Análisis de bacterias dominantes en queso bola de Ocosingo

En general, la microbiota de los quesos elaborados con leche cruda se origina en varias fuentes de contaminación empezando por el ganado. *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia* y *Enterobacter* son bacterias Gram negativas que pueden causar mastitis y en cuyo caso, el microorganismo puede excretarse directamente en la leche (Schukken *et al.*, 2012). También es probable que la leche se contamine camino a tanques de granel en granjas lecheras tradicionales, pero una limpieza inadecuada de ubres antes del ordeño y prácticas negligentes de desinfección de equipos de leche, junto con largos períodos entre la recolección y entrega de leche, así como la falta de refrigeración, puede aumentar sustancialmente la cantidad de bacterias Gram negativas (Kongo *et al.*, 2008).

Durante mucho tiempo se pensó que la presencia de coliformes indicaba contaminación fecal, sin embargo, descubrimientos sobre este grupo diverso de bacterias indican que solo una fracción es de origen fecal, mientras que la mayoría son contaminantes ambientales. Miembros de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y otros, son considerados coliformes ambientales (Martin *et al.*, 2016). Las enterobacterias encontradas en queso bola de Ocosingo son ubicuas, por lo que el aire, el agua, el alimento, el pasto, las heces y el suelo también podrían representar fuentes importantes de contaminación de la leche. Vacheyrou y colaboradores (2011) demostraron que la mayoría de los hongos y bacterias que se encuentran en la leche también estaban presentes en los ambientes de establos y salas de ordeño.

Es importante recordar que el ganado para la producción de leche utilizada en la elaboración del queso bola de Ocosingo es de libre pastoreo, por lo que frecuentemente están en contacto con heces, tierra y lodo que son fuentes microbianas importantes para la contaminación de la ubre.

Coton y colaboradores (2012) mencionan que las bacterias presentes en leche cruda no necesariamente tienen los mismos niveles en el queso y que el aumento en el número de células durante las primeras etapas de la fabricación del queso podría atribuirse en gran medida a la multiplicación de los microorganismos. En particular, los recuentos de Enterobacteriaceae pueden alcanzar 10^6 y 10^7 UFC/g en el núcleo de algunos quesos durante los primeros días de maduración y luego disminuir lentamente durante el proceso de maduración.

En la revisión de varios estudios de quesos artesanales elaborados con leche cruda proveniente de diferentes animales, se mostró que las bacterias indicadoras (*E. coli* y otras enterobacterias) que se encuentran en la leche cruda, a menudo aumentarán en número durante las etapas iniciales de la fabricación del queso, pero a medida que el pH disminuye debido a la fermentación de la lactosa, los niveles de indicadores disminuyen. A excepción de los quesos frescos, los niveles del indicador se reducen aún más durante el proceso de maduración del queso y a menudo no se encuentran o están presentes en niveles muy bajos en el producto terminado (Metz *et al.*, 2020). Kongo y colaboradores en el año 2008, realizaron el monitoreo de bacterias asociadas con problemas de seguridad en la elaboración de São Jorge, un queso tradicional portugués elaborado con leche cruda de vaca, ellos reportan cantidades viables de Enterobacterias en un rango de 5.9 a 7 log UFC/g en muestras de leche cruda, de 2.20 a 4.70 log UFC/g en muestras de queso madurado por un mes, de 1.60 a 3.3 log UFC/g en queso madurado tres meses y de 0 a 1.30 log UFC/g en queso madurado por cuatro meses. Este fenómeno podría ser observado en el queso bola de Ocosingo: con el análisis mediante DGGE varias enterobacterias resultaron formar parte de la microbiota dominante, sin embargo, es importante recordar que con esta técnica es imposible distinguir si el ADN recuperado proviene de células vivas o muertas, por otro lado los análisis

microbiológicos realizados por Camacho Mata (2019) en el equipo de trabajo, sobre estos mismos quesos y que están basados en métodos dependientes de cultivo, mostraron un nulo crecimiento de *Escherichia coli* lo que indica que en el producto final esta bacteria no es viable, es posible que este microorganismo al igual que las demás enterobacterias tuvieran un alto desarrollo en la leche cruda y por eso es posible encontrar gran cantidad de ADN presente en el queso, sin embargo, durante el proceso de elaboración se perdió la viabilidad de estos microorganismos. Esta viabilidad disminuye durante el proceso de maduración en donde el queso es un ambiente hostil, típicamente caracterizado por la presencia de sal, actividad del agua (a_w) menor a 0.95, valores de pH de 4.9 a 5.3, disponibilidad de oxígeno y una deficiencia de nutrientes, estas condiciones difíciles inhiben muchos grupos microbianos, excepto algunas especies de BAL que pueden tolerar las condiciones mencionadas (Coton *et al.*, 2012; Settanni & Moschetti, 2010).

Además de que los procesos de elaboración y maduración del queso pueden afectar en gran medida el crecimiento y la supervivencia bacteriana, los quesos de leche cruda son fuentes valiosas de cultivos bioprotectores, albergan bacterias ácido lácticas que son los primeros y principales agentes en la bioconservación de queso, las BAL muestran diversas actividades antimicrobianas, a través de la producción de diversos metabolitos incluidos el ácido láctico y las bacteriocinas que evitan la proliferación de bacterias y patógenos que deterioran el queso. Existen cepas de BAL de productos lácteos tradicionales capaces de inhibir los patógenos de queso más importantes (entre ellos *K. pneumoniae*) (Montel *et al.*, 2014; Mokoena, 2017). Bacterias ácido lácticas fueron encontradas en el queso bola de Ocosingo (tanto con DGGE como con los análisis microbiológicos antes realizados) como se mencionó anteriormente estas bacterias podrían estar aportando sustancias antimicrobianas que ayudan a eliminar a las enterobacterias. En nuestro grupo de trabajo, en 2019 Palacios Robledo trabajó con *L. fermentum* aislada de queso bola de Ocosingo y encontró actividad antibacteriana de esta cepa contra algunas enterobacterias como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Yersinia enterocolitica*.

En los análisis realizados por Camacho Mata (2019) que forman parte de los antecedentes de este proyecto, se reportó la presencia de *S. aureus* (10^3 UFC/g) en queso bola de Ocosingo, aunque se ha reportado la presencia de esta bacteria en otros quesos elaborados con leche cruda como el queso Chihuahua mediante técnicas dependientes de cultivo (Renyé Jr. *et al.*, 2011), con la técnica de DGGE no fue posible identificar a esta bacteria en queso bola. Muyzer y colaboradores (1993) mencionan que en el caso del análisis de perfiles de DGGE de comunidades microbianas, no podrán detectarse aquellos microorganismos que constituyan menos del 1% de la comunidad, es posible que este patógeno se encuentre presente en cantidades muy bajas en comparación con los demás grupos de bacterias, además para este análisis solamente se realizó la identificación de las bacterias consideradas dominantes, con lo cual se puede asegurar que aunque podría estar presente, esta bacteria no pertenece a la comunidad bacteriana dominante del queso.

Los resultados obtenidos sobre la comunidad bacteriana presente en queso bola de Ocosingo mediante PCR-DGGE se compararon con los obtenidos por Hernández González (Tesis en revisión) quien estudió el metagenoma de las mismas muestras de queso aquí analizadas, utilizando secuenciación dirigida de la región V3-V4 del ADNr 16S; sus resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Anotación taxonómica a nivel de género del queso bola de Ocosingo mediante la secuenciación de la región V3-V4 del ADNr 16S.

Abundancia	Queso bola chica	Queso bola grande
Dominante (>10%)	<i>Streptococcus</i> (75)	<i>Streptococcus</i> (74.24)
	<i>Klebsiella</i> (13.44)	<i>Klebsiella</i> (14.42)
Subdominante (1-9.9%)	<i>Enterobacter</i> (5.60)	<i>Enterobacter</i> (5.45)
	<i>Lactococcus</i> (2.44)	<i>Lactococcus</i> (2.36)
	<i>Enterococcus</i> (1.08)	<i>Enterococcus</i> (1.27)

* En paréntesis la abundancia relativa de cada género respecto al 100%

No se encontró una diferencia significativa entre la comunidad bacteriana presente en la muestra Bola chica y la muestra Bola grande, y se encontró que las bacterias dominantes son las pertenecientes al género *Streptococcus* seguido del género *Klebsiella*.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante la técnica de DGGE en este trabajo, en donde no se encontró diferencia en el patrón de bandeo obtenido con ambas muestras lo que indicó que entre ellas no hay variación de la comunidad bacteriana y al secuenciar las bandas dominantes se identificaron los géneros *Streptococcus* y *Klebsiella* entre otros.

Los géneros *Enterobacter* y *Lactococcus* fueron identificados como dominantes con DGGE, aunque mediante secuenciación dirigida estos géneros son subdominantes, dentro de este grupo tienen el porcentaje de abundancia relativa más alto. *Enterococcus* no fue identificado con DGGE, sin embargo, en la Tabla 13 se observa que este género presenta el porcentaje de abundancia relativa más bajo con lo cual no podría considerarse dentro de las bacterias dominantes con DGGE.

No existe un método ideal para conocer la comunidad bacteriana completa de una matriz analizada, aunque los resultados obtenidos con DGGE y secuenciación dirigida son consistentes, con DGGE también fue posible identificar otros géneros como *Escherichia*, *Acinetobacter Iwofii*, *Serratia marcescens*, *Lactococcus garviaea* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*, la mayoría pertenecientes a la comunidad dominante.

A la fecha, la secuenciación para realizar un análisis metagenómico sigue siendo un método costoso para algunos laboratorios, además de la necesidad de una gran capacidad de cómputo y conocimiento bionfornático. Por su parte DGGE es una técnica relativamente fácil de elaborar en cualquier laboratorio y como se pudo observar, la información obtenida con ambos métodos es consistente para la identificación de bacterias dominantes en una comunidad.

Se identificaron BAL y algunas enterobacterias como parte de la población dominante en queso bola de Ocosingo, la presencia de BAL es habitual al tratarse

de un producto lácteo fermentado, la presencia de enterobacterias se considera que se debe a una alta concentración de éstas en la leche cruda utilizada. Sin embargo, los resultados sugieren que dichas bacterias no se mantienen viables en el producto final, lo cual asegura la inocuidad del queso; aun así, se considera importante encontrar las fuentes de contaminación que estén aportando cantidades considerables de estos microorganismos indeseables a la materia prima y disminuirlas en lo más posible.

9. Conclusiones

Al analizar dos muestras diferentes de queso bola de Ocosingo provenientes del Rancho Laltic no se encontraron diferencias en los patrones de bandeo obtenidos por DGGE, lo que sugiere que la comunidad bacteriana presente es la misma.

Con las regiones amplificadas **V4-V7** y **V7-V8** del gen ADNr 16S se logró identificar como bacteria dominante a *Streptococcus*. Amplificando la región **V3** de este mismo gen se encontró mayor número de especies bacterianas dominantes identificadas como *Streptococcus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Klebsiella pneumoniae*.

Al utilizar un fragmento del gen *rpoB* para la identificación de bacterias dominantes se pudieron identificar a *Lactococcus garvieae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*. Tres especies no dominantes encontradas con este gen fueron *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*.

Las regiones **V4-V7** y **V7-V8** no son convenientes para diferenciar entre especies de *Streptococcus salivarius*, *S. vestibularius* y *S. thermophilus*.

La región **V3** no es eficaz para diferenciar entre algunas especies cercanamente relacionadas de los géneros *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, y *Serratia*.

La combinación de los resultados obtenidos con la amplificación de **V3** y un fragmento de *rpoB* enriquecieron la información sobre los microorganismos dominantes relacionados con el queso bola de Ocosingo.

10. Perspectivas

- Realizar un análisis microbiológico de la materia prima y del producto en diferentes etapas de elaboración, para conocer su calidad y poder definir en qué punto los microorganismos indeseables se incorporan al proceso.
- Buscar medios de cultivo adecuados para el aislamiento de las BAL encontradas y posteriormente analizar si producen compuestos con capacidad de inhibir patógenos de interés en alimentos, como bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas (PGHs).
- Analizar mediante DGGE quesos de diferentes productores para tener conocimiento de qué tan variable es la comunidad bacteriana del producto en toda la región.
- Determinar si las bacterias indeseables encontradas están viables, a través de métodos dependientes de cultivo.

11. Referencias

- Abdelfatah, E. N., & Mahboub, H. (2018). Studies on the effect of *Lactococcus garvieae* of dairy origin on both cheese and Nile tilapia (*O. niloticus*). *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(2), 201–207.
- Adékambi, T., Drancourt, M., & Raoult, D. (2009). The *rpoB* gen as a tool for clinical microbiologist. *Trends in Microbiology*, 17(1), 37-45.
- Abdou, A. M. (2003). Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 127–132.
- Afshari, R., Pillidge, C.J., Dias, D.A., Osborn, A.M., & Gill, H. (2018). Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavor and quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(1), 33-47.
- Agudelo, M. A., Cesín, A., & Thomé, H. (2016, marzo). Alimentos emblemáticos. La vinculación del queso bola de Ocosingo con la oferta turística regional. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 13(1), 131-149.
- Agudelo, L.M.A., & Cesín, V.A. (2013). Evaluación socioeconómica de los productores de queso Bola de Ocosingo, Chiapas. En Cavallotti, B., Ramírez, B., Cesín, A., Rojo, G., & Marcof, C. (Eds.). *Seguridad Alimentaria y Producción Ganadera en Unidades Campesinas*. (pp.173-184). México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Albenzio, M., Corbo, M.R., Rehman, S.U., Fox, P.F., De Angelis, M., & Corsetti, A. (2001). Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1-2), 35–48.
- Ampe, F., ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., & Guyot, J.P. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied Environmental Microbiology*, 65(12), 5464-73.
- Aquilanti, L., Santarelli, S., Babini, V., Osimani, A., Garofalo, C., Polverigiani, S., & Clementi, F. (2016). PCR-DGGE for the profiling of cheese bacterial communities: strengths and weaknesses of a poorly explored combined approach. *Dairy Science and Technology*, 96(5), 747–761.
- Bandyopadhyay, S., Banerjee, J., Bhattacharyya, D., Samanta, I., Mahanti, A., Dutta, T. K., Ghosh, S., Nanda, P. K., Dandapat, P., & Bandyopadhyay, S. (2018). Genomic identity of fluoroquinolone-resistant blaCTX-M-15-Type ESBL and

pMampC β -Lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* from buffalo milk, India. *Microbial Drug Resistance*, 24(9), 1345–1353.

Baruzzi, F., Lagonigro, R., Quintieri, L., Morea, M., & Caputo, L. (2012). Occurrence of non-lactic acid bacteria populations involved in protein hydrolysis of cold-stored high moisture Mozzarella cheese. *Food microbiology*, 30(1), 37–44.

Beresford, T., Fitzsimons, N., Brennan, N., & Cogan, T. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259–274.

Blaya, J., Barzideh, Z., & LaPointe, G. (2018). Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 3611-3629.

Bondoso, J., Harder, J., & Lage, O.M. (2013). *rpoB* gene as a novel molecular marker to infer phylogeny in *Planctomycetales*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(4), 477-488.

Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608.

Busse, H.J. (2016). Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter* sensu lato, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 9-37.

Byun, S. O., Fang, Q., Zhou, H., & Hickford, J. G. (2009). An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 385(1), 174–175.

Callon, C., Millet, L., & Montel, M.C. (2014). Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *Journal of Dairy Research*, 71(2), 231-244.

Camacho Mata Alberto. (2019). Tesis de Licenciatura. Caracterización química y microbiológica de quesos bola de Ocosingo. Universidad Nacional Autónoma de México.

Câmara, S. P., Dapkevicius, A., Riquelme, C., Elias, R. B., Silva, C., Malcata, F. X., & Dapkevicius, M. (2019). Potential of lactic acid bacteria from Pico cheese for starter culture development. *Food Science and Technology International*, 25(4), 303–317.

- Campos, G., Robles, L., Alonso, R., Nuñez, M., & Picon, A. (2011). Microbial dynamics during the ripening of a mixed cow and goat milk cheese manufactured using frozen goat milk curd. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 4766–4776.
- Casalta, E., & Montel, M. C. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 271–273.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 278–288.
- Castellanos-Rozo, J., Pérez Pulido, R., Grande, M. J., Lucas, R., & Gálvez, A. (2020). Analysis of the bacterial diversity of Paipa cheese (a traditional raw cow's milk cheese from Colombia) by high-throughput sequencing. *Microorganisms*, 8(2), 218.
- CEIEG. 2018. CIGECH Compendio de Información Geográfica y Estadística de Chiapas en línea]. Disponible en http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/home/wp-content/uploads/downloads/productosdgei/CIGECH/GeoMA/cigech_geo_medioamb.html [último acceso el 14 de enero 2019).
- Cervantes-Escoto, F., Villegas-Gante, A., & Espinoza-Ortega, A. (2014). *Atlas de los quesos mexicanos genuinos*. 3ª edición. Biblioteca Básica de Agricultura. Estado de México, México.
- Chen, Y. S., Wang, L. T., Wu, Y. C., Mori, K., Tamura, T., Chang, C. H., Chang, Y. C., Wu, H. C., Yi, H. H., & Wang, P. Y. (2020). *Leuconostoc litchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from lychee. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(3), 1585–1590.
- Coton, M., Delbés-Paus, C., Irlinger, F., Desmasures, N., Le Fleche, A., Stahl, V., Montel, M. C., & Coton, E. (2012). Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. *Food microbiology*, 29(1), 88–98.
- D'Angelo, L., Cicotello, J., Zago, M., Guglielmotti, D., Quiberoni, A., & Suárez, V. (2017). *Leuconostoc* strains isolated from dairy products: response against food stress conditions. *Food microbiology*, 66, 28–39.
- Dahllöf, I., Baillie, H. & Kjelleberg, S. (2000). *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3376-3380.
- Davis, G.S., & Price, L.B. (2016). Recent research examining links among *Klebsiella pneumoniae* from food, food animals, and human extraintestinal infections. *Current Environmental Health Reports*, 3(2), 128-135.

- De la Rosa-Hernández, M. C., Cadena-Ramírez, A., Téllez-Jurado, A., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Chávez-Urbiola, E. A., & Castro-Rosas, J. (2018). Presence of multidrug-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *Escherichia coli*, and enterotoxigenic *Escherichia coli* on fresh cheeses from local retail markets in Mexico. *Journal of Food Protection*, 81(11), 1748–1754.
- Decimo, M., Morandi, S., Silveti, T., & Brasca, M. (2014). Characterization of Gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *Journal of Food Science*, 79(10), M2081–M2090.
- Delorme, C., Abraham, A. L., Renault, P., & Guédon, E. (2015). Genomics of *Streptococcus salivarius*, a major human commensal. *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 381–392.
- Deperrois-Lafarge, V., & Meheut, T. (2012). Use of the *rpoB* gene as an alternative to the V3 gene for the identification of spoilage and pathogenic bacteria species in milk and milk products. *Letters in Applied Microbiology*, 55(2), 99-108.
- Díaz, R.G., & Wachter R.C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 45(1-2), 30–40.
- Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Rolle, L., Zeppa, G., & Cocolin, L. (2008). Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 302–311.
- Duan, Y., Tan, Z., Wang, Y., Li, Z., Li, Z., Qin, G., Huo, Y., & Cai, Y. (2008). Identification and characterization of Lactic Acid Bacteria isolated from Tibetan Qula cheese. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 54(1), 51–60.
- Dugat-Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou, A.S., Bonnarme P., & Irlinger, F. (2016). Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 265-273.
- Eck, A. (2000). What is a cheese?. In: A.Eck y JC Gilis (Eds). *Cheesemaking: From Science to Quality Assurance* (pp. 661-662). Lavoisier Publishing.
- Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., & Quirasco Baruch, M. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*, 57, 116-127.
- Feligini, M., Panelli, S., Buffoni, J. N., Bonacina, C., Andrighetto, C., & Lombardi, A. (2012). Identification of microbiota present on the surface of Taleggio cheese using PCR-DGGE and RAPD-PCR. *Journal of Food Science*, 77(11), M609–M615.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39,783-791.

Fernández, S. M., & Le Borgne, S. (2014). DGGE: Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante. En: Cornejo, R.A., Serrato, D.A., Rendón, A.B. & Rocha, M.M.G. (Eds.). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 149-174). México, Semarnat, INECC y UAM-I.

Fortina, M.G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A., & Manachini, P.L. (2003) Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma Piemontese. *Food Microbiology*, 20, 397–404.

Fortina, M. G., Ricci, G., Foschino, R., Picozzi, C., Dolci, P., Zeppa, G., Cocolin, L., & Manachini, P. L. (2007). Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. *Journal of Applied Microbiology*, 103(2), 445–453.

Foschino, R., Picozzi, C., Borghi, M., Cerliani, M.C., & Cresci, E. (2006) Investigation on the microflora of Caprino Lombardo cheese from raw goat milk. *Italian Journal of Food Science*, 18, 33–50.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., & McSweeney, P.L.H. (2000). In: Fox, P., Guinee, T., Cogan, T.M. (Eds.). *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publications, Gaithersburg, MD, USA.

Franciosi, E., De Sabbata, G., Gardini, F., Cavazza, A., & Poznanski, E. (2011). Changes in psychrotrophic microbial populations during milk creaming to produce Grana Trentino cheese. *Food Microbiology*, 28(1), 43–51.

Friman, M. J., Eklund, M. H., Pitkälä, A. H., Rajala-Schultz, P. J., & Rantala, M. (2019). Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta veterinaria Scandinavica*, 61(1), 54.

Garofalo, C., Bancalari, E., Milanovic, V., Cardinali, F., Osimani, A., Savo, S. M. L., Bottari, B., Bernini, V., Aquilanti, L., Clementi, F., Neviani, E., & Gatti, M. (2017). Study of the bacterial diversity of foods: PCR-DGGE versus LH-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 242, 24-36.

Gibello, A., Galán-Sánchez, F., Blanco, M. M., Rodríguez-Iglesias, M., Domínguez, L., & Fernández-Garayzábal, J. F. (2016). The zoonotic potential of *Lactococcus garvieae*: An overview on microbiology, epidemiology, virulence factors and relationship with its presence in foods. *Research in Veterinary Science*, 109, 59–70.

González-Córdova, A., Yescas, C., Ortiz-Estrada, A., De la Rosa-Alcaraz, M., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2016). Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3250–3262.

Gonçalves, M.T., Benito, M.J., De Guía Córdoba, M., Egas, C., Merchán, A.V., Galván, A.I., & Ruiz-Moyano, S. (2018). Bacterial Communities in Serpa Cheese by Culture Dependent Techniques, 16S rRNA Gene Sequencing and High-throughput Sequencing Analysis. *Journal of Food Science*, 8(5), 1333-1341.

Gori, K., Ryssel, M., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2013). Isolation and identification of the microbiota of Danish farmhouse and industrially produced surface-ripened cheeses. *Microbial ecology*, 65(3), 602–615.

Grajales Herrera Sheila Ixchel. (2016). Caracterización de la ecología microbiana del queso bola de Ocosingo, Chiapas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Chiapas.

Hao, Y., Zhao, L., Zhang, H., Zhai, Z., Huang, Y., Liu, X., & Zhang, L. (2010). Identification of the bacterial biodiversity in koumiss by denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 1926–1933.

Hugenholtz, P., Goebel, B.M., & Pace, N.R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180, 4765-4774.

Hussien, H., Elbehiry, A., Saad, M., Hadad, G., Moussa, I., Dawoud, T., Mubarak, A., & Marzouk, E. (2019). Molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from cheese and biocontrol of Shiga toxicogenic *E. coli* with essential oils. *Italian Journal of Food Safety*, 8(3), 8291.

INAFED, Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal.

Jans, C., Gerber, A., Bugnard, J., Njage, P. M., Lacroix, C., & Meile, L. (2012). Novel *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* variants harboring lactose metabolism genes homologous to *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology*, 31(1), 33–42.

Jany, J.L., & Barbier, G. (2008). Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*, 25(7), 839–848.

Karabey, B., Eroglu, D., Vural, C., Ozdemir, G., Yerlikaya, O., & Kinik, O. (2018). Determination of the microbial flora in traditional İzmir Tulum cheeses by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Journal of Food Science and Technology*, 55(3), 956–963.

Khayaletu, N. (2013). Identifying bacteria and studying bacterial diversity using the 16S ribosomal RNA gene-based sequencing techniques: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 7(49), 5533–5540.

Kongo, J. M., Gomes, A. P., & Malcata, F. X. (2008). Monitoring and identification of bacteria associated with safety concerns in the manufacture of São Jorge, a

Portuguese traditional cheese from raw cow's milk. *Journal of Food Protection*, 71(5), 986–992.

Kornaki, J.L., & Johnson, J.L., 2001. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes, F.P., Ito, K. (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, fourth ed. American Public Health Association, pp. 69–82.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.

Lacerda, I. C., Gomes, F. C., Borelli, B. M., Faria, C. L., Jr, Franco, G. R., Mourão, M. M., Morais, P. B., & Rosa, C. A. (2011). Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and minas cheese production using culture-independent 16s rRNA gene sequence analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 650–657.

Lindsey, R. L., Garcia-Toledo, L., Fasulo, D., Gladney, L. M., & Strockbine, N. (2017). Multiplex polymerase chain reaction for identification of *Escherichia coli*, *Escherichia albertii* and *Escherichia fergusonii*. *Journal of Microbiological Methods*, 140, 1–4.

Licitra, G., & Carpino, S. (2014). The microfloras and sensory profiles of selected protected designation of origin Italian cheeses. *Microbiology Spectrum*, 2(1), 2007-2012.

Lopez, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M., VanderGheynst, J., & Mills, D.A. (2003). Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Environmental Microbiology*, 69(11), 6801-7.

López, R., Henández-Montes, A., Villegas-de Gante, A., & Santos-Moreno, A. (2015, marzo). Caracterización socio técnica del Queso Bola de Ocosingo, Chiapas. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 2(2), 345–353.

Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J. A., & Franco, D. (2018). Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability. *Innovative Technologies for Food Preservation*, 53–107.

Machado, S. G., Baglinière, F., Marchand, S., Van Coillie, E., Vanetti, M. C. D., De Block, J., & Heyndrickx, M. (2017). The biodiversity of the microbiota producing heat-

resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 8, 302.

Maia, D., Haubert, L., Dos Santos Soares, K., de Fátima Rauber Würfel, S., & da Silva, W. P. (2019). *Butia odorata* Barb. Rodr. extract inhibiting the growth of *Escherichia coli* in sliced mozzarella cheese. *Journal of Food Science and Technology*, 56(3), 1663–1668.

Mangia, N.P., Fancello, F., & Deiana, P. (2016). Microbiological characterization using combined culture dependent and independent approaches of Casizolu pasta filata cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 120(2), 329-45.

Martin, N. H., Trmčić, A., Hsieh, T. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2016). The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1549.

Martín-Platero, A.M., Maqueda, M., Valdivia, E., Purswani, J., & Martínez-Bueno, M. (2009). Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiology*, 26(3), 294-304.

Martins, M. L., Pinto, U. M., Riedel, K., & Vanetti, M. (2018). Quorum sensing and spoilage potential of psychrotrophic Enterobacteriaceae isolated from milk. *BioMed Research International*, 2018, 2723157.

Massa, S., Gardini, F., Sinigaglia, M., & Guerzoni, M. E. (1992). *Klebsiella pneumoniae* as a spoilage organism in mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 75(6), 1411–1414.

Mei, J., Guo, Q., Wu, Y., & Li, Y. (2014). Microbial diversity of a Camembert-type cheese using freeze-dried Tibetan kefir coculture as starter culture by culture-dependent and culture-independent methods. *Public Library of Science*, 9(10).

Metz, M., Sheehan, J., & Feng, P. (2020). Use of indicator bacteria for monitoring sanitary quality of raw milk cheeses - A literature review. *Food Microbiology*, 85, 103283.

Mizrahi-Man, O., Davenport, E.R., & Gilad, Y. (2013). Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. *Public Library of Science*, 8(1).

Mokoena M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.

Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Internal Journal of Food Microbiology*, 177, 136-154.

Motato, K. E., Milani, C., Ventura, M., Valencia, F. E., Ruas-Madiedo, P., & Delgado, S. (2017). Bacterial diversity of the Colombian fermented milk "Suero Costeño" assessed by culturing and high-throughput sequencing and DGGE analysis of 16S rRNA gene amplicons. *Food Microbiology*, 68, 129–136.

Murakami, K.S. (2015). Structural biology of bacterial RNA Polymerase. *Biomolecules*, 5, 848-864.

Muyzer, G., E.C. De Waal, & A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.

Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C.O., & Jannasch, H.W. (1995). Phylogenetic relationship of *Thiomicrospora* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology*, 164, 165-72.

Neilson, J. W., Jordan, F. L., & Maier, R. M. (2013). Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 92(3), 256–263.

Nocker, A., Burr, M., & Camper, A.K. (2007). Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology*, 54(2), 276-289.

NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

Ogier, J. C., Casalta, E., Farrokh, C., & Saïhi, A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 286–290.

Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M., & Swings, J. (2005). Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 267–271.

Perumbakkam, S., & Craig, A. M. (2011). Design and in vitro evaluation of new *rpoB*-DGGE primers for ruminants. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(1), 156–169.

Petti C. A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases*, 44(8), 1108–1114.

Pisano, M.B., Rosa, A., Putzu, D., Cesare Marincola, F., Mossa, V., Viale, S., Fadda, M.E., & Cosentino, S. (2020) Influence of autochthonous putative probiotic cultures on microbiota, lipid components and Metabolome of caciotta cheese. *Frontiers in Microbiology*, 21, 11:583745.

Poznanski, E., Cavazza, A., Cappa, F., & Cocconcelli, P.S. (2004). Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *International Journal of Food Microbiology*, 92(2), 141-51.

Ramírez-Pacheco, A., Moreno-Guerrero, S., & Medina-Sanson A. (2013). Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 12(3), 162-173.

Ramírez-López C., & Vélez-Ruiz, J.F. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos De Ingeniería De Alimentos*, 131-148.

Randazzo, C. L., Torriani, S., Akkermans, A. D., de Vos, W. M., & Vaughan, E. E. (2002). Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1882–1892.

Renouf, V., Claisse, O., Miot-Sertier, C., & Lonvaud-Funel, A. (2006). Lactic acid bacteria evolution during winemaking: use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology*, 23(2), 136-45.

Renye, J. A., Jr, Somkuti, G. A., Van Hekken, D. L., & Guerrero Prieto, V. M. (2011). Short communication: characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3311–3315.

Ribeiro Júnior, J. C., de Oliveira, A. M., Silva, F. G., Tamanini, R., de Oliveira, A., & Beloti, V. (2018). The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 75–83.

Rojas, R., Narváez, J., Zamudio, M., & Mena, M.E. 2008. A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Molecular Biotechnology*. 40,13-17.

Ryssel, M., Johansen, P., Al-Soud, W. A., Sørensen, S., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2015). Microbial diversity and dynamics throughout manufacturing and ripening of surface ripened semi-hard Danish Danbo cheeses investigated by culture-independent techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 124–130.

Saitou N., & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.

Settanni, L. & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27, 691-697.

SIAP. Panorama de la lechería en México. <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20Cuarto%20Trimestre%202019.pdf>, Mayo 2020.

Silva, L. F., Casella, T., Gomes, E. S., Nogueira, M. C., De Dea Lindner, J., & Penna, A. L. (2015). Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Journal of Food Science*, 80(2), M411–M417.

Strathdee, F., & Free, A. (2013). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). In: Makovets, S. (eds) *DNA Electrophoresis. Methods in molecular biology (methods and protocols)*, (pp. 145-157). Humana Press, Totowa, NJ.

Sutherland, C., & Murakami, K. S. (2018). An introduction to the structure and function of the catalytic core enzyme of *Escherichia coli* RNA polymerase. *EcoSal Plus*, 8(1).

Tabla, R., Gómez, A., Simancas, A., Rebollo, J. E., Molina, F., & Roa, I. (2018). Early blowing in raw goats' milk cheese: gas production capacity of Enterobacteriaceae species present during manufacturing and ripening. *Journal of Dairy Research*, 85(3), 331–338.

Tamura K., & Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.

Torres-Vitela, M. R., Mendoza-Bernardo, M., Castro-Rosas, J., Gomez-Aldapa, C. A., Garay-Martinez, L. E., Navarro-Hidalgo, V., & Villarruel-López, A. (2012). Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and Staphylococcal enterotoxin in two types of Mexican fresh cheeses. *Journal of Food Protection*, 75(1), 79–84.

Trmčić, A., Chauhan, K., Kent, D. J., Ralyea, R. D., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2016). Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6105–6120.

Vacheyrou M., Normand A.-C., Guyot P., Cassagne C., Piarroux R., & Bouton Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of Food Microbiology*. 146, 253–262.

Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297-313.

Van Hannen, E., Gzwart, P., van Agterveld, Gons, H., Ebert, J., & Laanbroek, H. (1999). Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 795-801.

- Větrovský, T., & Baldrian, P. (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *Public Library of Science*, 8(2), e57923.
- Villegas, A., & Cervantes, F. (2017). *De quesos mexicanos tradicionales y sus imitaciones*. 1^a ed. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Wang, Y., & Qian, P.Y. (2009). Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomics studies. *Public Library of Science*, 4(10). e7401
- Wolfe, B.E., Button, J.E., Santarelli, M., & Dutton, R.J. (2014). Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell*, 158(2), 422-433.
- Yang, Y., Higgins, C. H., Rehman, I., Galvao, K. N., Brito, I. L., Bicalho, M. L., Song, J., Wang, H., & Bicalho, R. C. (2019). Genomic diversity, virulence, and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains from cows and humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(6).
- Yu, Z., & Morrison, M. (2004). Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4800–4806.
- Yunita, D. & Dodd, C. (2018). Microbial community dynamics of a blue-veined raw milk cheese from the United Kingdom. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 4923–4935.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858.
- Zupancic, K., Kriksic, V., Kovacevic, I., & Kovacevic, D. (2017). Influence of oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on ear and oral cavity health in humans: systematic review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(2), 102–110.

12. Anexo

A. Obtención del paquete celular de las bacterias de referencia

Los gliceroles de las cepas a utilizar se descongelaron en el momento de su uso y se empleó el siguiente procedimiento experimental

1. En la campana de flujo laminar inocular 100 μ L del glicerol con la cepa correspondiente en 10 mL de medio MRS líquido estéril.
2. Incubar por 24 horas a 37 °C y 200 rpm.
3. Centrifugar a 8500 rpm/5 min.
4. Desechar el sobrenadante y lavar el paquete 3 veces con solución salina 0.85%, pH=7, centrifugar en cada ocasión en las condiciones descritas en el punto anterior.
5. Resuspender el paquete en 1 mL de solución salina 0.85%, pH =7 y transferir a un tubo de 2 mL (eppendorf).
6. Centrifugar a 14000 rpm durante 10 min a 4°C y eliminar el sobrenadante.

Nota: los paquetes celulares se almacenaron a -20°C hasta su uso.

B. Obtención del paquete celular del queso

Las muestras del queso bola de Ocosingo se mantuvieron en refrigeración (4°C).

1. Pesar en la campana de flujo laminar 15g de cada una de las muestras dentro de las bolsas para Stomacher (Seward).
2. Adicionar a cada muestra 50 mL de citrato de sodio al 2%, pH =8.
3. Homogeneizar durante 2 min a alta velocidad dentro del Stomacher, para llevar a cabo una ruptura mecánica de la matriz del queso.
4. Adicionar 1 mL de solución de neutrasas (Novo Nordisk) dentro de la campana de flujo laminar, con el fin de romper la red proteínica del queso.
5. Mezclar a alta velocidad dentro el Stomacher durante 1 min.
6. Incubar durante 1 h a 100 rpm y 45°C.
7. Posteriormente dividir la mezcla en 2 tubos estériles para centrifuga de 50 mL (Falcon).
8. Centrifugar a 3500 rpm durante 7 min a 4°C para lograr separar las fracciones de proteína y grasa de las células de los microorganismos presentes en el queso.
9. Transferir la fase intermedia, la cual contiene las células de los microorganismos, a un tubo de 50 mL estéril con ayuda de una micropipeta de 5 mL.
10. Centrifugar a 8500 rpm/5min/4°C.

11. Desechar el sobrenadante y lavar el paquete 3 veces con solución salina 0.85%, pH =7, centrifugar en cada ocasión en las condiciones descritas en el punto anterior.
 12. Resuspender el paquete en 1 mL de solución salina 0.85%, pH =7, transferir a un tubo de 2 mL (eppendorf)
 13. Centrifugar a 14000 rpm durante 10 min a 4°C, eliminar el sobrenadante.
- Nota: los paquetes celulares se almacenaron a -20°C hasta su uso.

C. Extracción y purificación de DNA

1. Premezclar en un tubo de 2 mL, 10 µL de proteinasa K (10mg/mL), 1 mL de solución de lisis y 10 µL de lisozima (10mg/mL), agitar vigorosamente.
2. Adicionar la mezcla al paquete, agitar vigorosamente.
3. Incubar a 65 °C/ 600 rpm/ 30 minutos
4. Dividir la muestra en 2 tubos eppendorf de 2 mL.
5. Dentro de la campana añadir cloroformo en relación 1:1 (aproximadamente 500 µL)
6. Agitar vigorosamente, centrifugar a 10000 rpm/5 minutos/ 4°C.
7. Con ayuda de una micropipeta transferir la fase superior a un tubo de 2 mL añadir buffer de unión en relación 1:1. Si la muestra presenta turbidez, se centrifuga a 14000 rpm/ 5 minutos/ 4°C.
8. Transferir a una columna montada en un tubo de 2 mL, centrifugar a 14000 rpm /1 minuto.
9. Lavar la columna con 800 µL de buffer de lavado, centrifugar a 14000 rpm/ 1 minuto.
10. Agregar 700 µL de etanol al 75% (por triplicado) centrifugando a 14000 rpm/ 1 minuto en cada ocasión.
11. Secar la columna centrifugando en las mismas condiciones, desechar el tubo y colocar la columna sobre un tubo de 1.5 mL.
12. Adicionar 50 µL de buffer de elusión (1X TE) previamente calentado a 65 °C/ 10 minutos.
13. Centrifugar a 14000 rpm/1 minuto, desechar la columna y conservar a -20 °C hasta su utilización.

D. Tinción con plata (Byun *et al.*, 2009)

1. Una vez desmontado el gel del equipo, sumergirlo en la solución de tinción (etanol 10%, ácido acético 0.2%, nitrato de plata 0.2%) durante 20 minutos en agitación.
2. Enjuagar con agua destilada por 1 minuto.
3. Sumergir en la solución reveladora (hidróxido de sodio 3%, formaldehído 0.1%) de 5 a 10 minutos o hasta la aparición de bandas, mantener en agitación. Previamente llevar la solución a una temperatura de 55°C.
4. Sumergir en la solución de paro (etanol 10%, ácido acético 0.5%) durante 1 minuto.
5. Enjuagar con agua destilada.

Tablas AI. Condiciones de PCR para cebadores SIN grapa.

Pedio2:644/ FirR:1244 y 338F/B518R.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 seg.	1
Desnaturalización	98	30 seg	35
Alineamiento	68	30 seg	
Extensión	72	1 min.	
Extensión final	72	10 min.	1

WBAC1/WBAC2.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 seg.	1
Desnaturalización	98	30 seg	35
Alineamiento	73	30 seg	
Extensión	72	1 min.	
Extensión final	72	10 min.	1

rpoB1698F/rpoB2041R.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 seg.	1
Desnaturalización	98	30 seg	35
Alineamiento	56.3	30 seg	
Extensión	72	1 min.	
Extensión final	72	10 min.	1

Tablas AII. Condiciones de PCR para cebadores CON grapa.

rpoB1698F-GC/rpoB2041R.

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

338F-GC/B518R

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	5 min
20	95	1 min
	65	1 min
	72	1 min
10	95	1 min
	55	1 min
	72	1 min
1	72	10 min

Pedio2:644-GC/ FirR:1244

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	3 min
35	95	1 min
	60	45 seg
	72	1 min
1	72	10 min

WBAC1-GC/WBAC2.

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	5 min
30	95	1 min
	67	45 seg
	72	1 min
1	72	7 min

Tabla AIII. Porcentaje de acrilamida y tamaño de productos.

% acrilamida/bis	Rango de separación bp
6	300-1000
8	200-400
10	100-300

Tablas AIV. Reactivos para DGGE.

Soluciones desnaturizantes

Reactivo	Acrilamida/Bis 40%		
	6%	8%	10%
Acrilamida/Bis 40%	2.7 mL	3.6 mL	4.5 mL
TAE 50X	0.36 mL	0.36 mL	0.36 mL
Formamida	-	-	-
Urea	-	-	-
Agua desionizada	-	-	-
Volumen total	18 mL	18 mL	18 mL

Reactivo	Concentración de solución desnaturizante (%)	
	20	80
Formamida (mL)	1.44	5.76
Urea (g)	1.51	6.05
Volumen final (mL)	18	18

TAE 1X

Reactivo	Cantidad (mL)
Buffer TAE 50X	140
Agua desionizada	6 860
Volumen total	7 000

Buffer de carga 2X

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Azul de bromofenol 2%	0.25	0.05%
Cianol xilenol 2%	0.25	0.05%
Glicerol 100%	7.0	70%
Agua desionizada	2.5	-
Vol. Final	10.0	

Tabla AV. Digestión de plásmido

REACTIVO	CANTIDAD
Agua libre de nucleasas	-
Buffer R 10X	2 μ L
Plásmido (200 ng/ μ L)	-
XhoI	0.5 μ L
Volumen total	20 μ L

La reacción de digestión se incubó a 37°C por 16 horas, posteriormente la enzima se inactivó a 80°C por 20 minutos.

Tablas AVI. Intensidad Relativa promedio y Dominancia Relativa.

V4-V7 (Pedio2:644/FirR:1244)

No. banda	Bola GRANDE	Bola CHICA	IRp
1	0.049	0.054	0.051
2	0.104	0.009	0.056
3	0.009	0.027	0.018
4	0.755	0.481	0.618
5	0.094	0.028	0.061
6	0.362	0.406	0.384
7	0.817	1.000	0.909
8	0.304	0.301	0.303
9	0.189	0.247	0.218
10	0.135	0.114	0.125
Dominancia Relativa			0.274

V7-V8 (WBAC1/WBAC2)

No. banda	Bola CHICA	Bola GRANDE	IRp
1	0.008	0.027	0.017
2	0.045	0.026	0.035
3	0.030	0.061	0.045
4	0.010	0.017	0.013
5	0.012	0.020	0.016
6	0.005	0.011	0.008
7	0.013	0.008	0.011
8	0.012	0.005	0.008
9	0.235	0.253	0.244
10	0.150	0.217	0.183
11	0.016	0.013	0.014
12	0.005	0.007	0.006
13	0.006	0.012	0.009
14	0.015	0.004	0.009
15	0.404	1.000	0.702
Dominancia Relativa			0.088

rpoB (*rpoB1698F/rpoB2041R*)

No. banda	bola CHICA	bola GRANDE	Irp
1	0.031	0.000	0.031
2	0.036	0.000	0.036
3	0.117	0.021	0.069
4	0.147	0.038	0.092
5	1.000	0.902	0.951
6	0.005	0.000	0.005
7	0.048	0.031	0.040
8	0.052	0.000	0.052
9	0.548	0.127	0.337
10	0.864	0.466	0.665
11	0.132	0.000	0.066
Dominancia Relativa			0.213

V3 (*338F/B518R*)

banda	bola CHICA	bola GRANDE	IRp
1	0.007	0.002	0.005
2	0.034	0.059	0.046
3	0.075	0.023	0.049

4	0.005	0.023	0.014
5	0.008	0.009	0.009
6	0.080	0.065	0.073
7	0.003	0.021	0.012
8	0.011	0.019	0.015
9	0.264	0.231	0.248
10	0.039	0.018	0.028
11	0.012	0.038	0.025
12	0.229	0.255	0.242
13	0.001	0.001	0.001
14	0.054	0.048	0.051
15	0.020	0.009	0.015
16	0.017	0.029	0.023
17	0.227	0.292	0.259
18	0.104	0.108	0.106
19	0.096	0.108	0.102
20	0.009	0.009	0.009
21	0.727	0.342	0.534
22	0.050	0.053	0.051
23	0.019	0.010	0.014
24	0.923	1.000	0.961
25	0.029	0.005	0.017
26	0.010	0.012	0.011
27	0.149	0.155	0.152
28	0.010	0.010	0.010
29	0.097	0.099	0.098
30	0.015	0.028	0.021
31	0.005	0.010	0.007
32	0.475	0.575	0.525
33	0.002	0.002	0.002
34	0.031	0.015	0.023
35	0.608	0.802	0.705
36	0.345	0.149	0.247
37	0.084	0.138	0.111
38	0.012	0.036	0.024
39	0.056	0.072	0.064
40	0.403	0.587	0.495
41	0.016	0.066	0.041
42	0.032	0.066	0.049
43	0.049	0.075	0.062
44	0.415	0.554	0.485
45	0.035	0.070	0.053
46	0.050	0.097	0.074

47	0.284	0.410	0.347
48	0.037	0.124	0.081
49	0.093	0.210	0.152
Dominancia Relativa			0.138

