



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de la microbiota bacteriana del Queso Bola de Ocosingo a través de métodos moleculares.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:
Biól. Patiño Hernández Violeta Monserrat

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
[Facultad de Química UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja
[Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM](#)
Dr. Francisco Ruiz Terán
[Facultad de Química UNAM](#)
Ciudad de México. Agosto, 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la tutoría de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch en el laboratorio 312 del conjunto E, del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco ampliamente los consejos, enseñanzas y apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio, a la M. en C. Cindy Adriana Estrada Hernández y a mi compañera M. en C. Novia Minerva Linares Arévalo.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM
Dr. Francisco Ruiz Terán, Facultad de Química UNAM

Este proyecto 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 clave 5000-9102. Se agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

El jurado asignado:

Presidente Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González-Saravia. Facultad de Química, UNAM.

Vocal Dra. Carmina Montiel Pacheco - Facultad de Química, UNAM.

Vocal Dr. Edmundo Calva Mercado - Instituto de Biotecnología, UNAM.

Vocal Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo– Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Secretario Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio - Facultad de Química, UNAM.

*A mi hijo, Emilio Said.
Porque tú siempre serás todo en mi vida y la motivación de seguir cada día.*

*A mis padres.
Por su apoyo incondicional y por la gran familia que lograron formar.*



CONTENIDO

Resumen	8
1. Introducción.....	10
1.1 Quesos.....	10
1.2 Quesos Artesanales Mexicanos	11
1.3 Queso Bola de Ocosingo.....	12
1.3.1 Proceso de manufactura	14
1.4 Diversidad de la Microbiota de los Quesos artesanales	17
1.4.1 Bacterias ácido lácticas iniciadoras.....	17
1.4.2 Microbiota secundaria.....	18
1.4.3 Bacterias patógenas	19
1.5 Factores que determinan el crecimiento de microorganismos	19
1.6 Métodos para identificación de microorganismos	21
1.6.1 Técnicas dependientes de cultivo (TDC) e independientes de cultivo (TIC).....	21
1.6.2 DGGE: Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante	22
1.6.3 Ventajas y desventajas de la técnica DGGE	25
1.7 Antecedentes: Análisis microbiológico del Queso Bola de Ocosingo	28
2. Justificación.....	32
3. Hipótesis.....	32
4. Objetivos	33
4.1 General.....	33
4.2 Particulares.....	33
5. Estrategia experimental	34
6. Materiales y métodos.....	35
6.1 Obtención de la muestra	35
6.2 Análisis fisicoquímico.	35
6.3 Análisis de la microbiota.....	36
6.31 Recuperación de paquete celular	36
6.32 Extracción de ADN de microorganismos del Queso Bola.....	36
6.33 Amplificación del gen <i>rpoB</i>	37
6.34 Amplificación de la región V3 del DNAr 16S	38

6.35 DGGE paralelo	40
6.36 Análisis del perfil de bandas en DGGE paralelo	40
6.37 Tratamiento de las bandas escindidas del gel	42
6.38 Clonación.....	42
6.39 Purificación y amplificación del inserto a clonar	44
6.40 Secuenciación y análisis.....	45
6.41 Análisis inferencia filogenética	45
7. Resultados y Discusión	46
7.1 Descripción histórica y proceso de elaboración del Queso Bola de Ocosingo	46
7.2 Colección de muestras y observaciones	48
7.3 Evaluación de parámetros fisicoquímicos	53
7.31 Actividad Acuosa (a_w)	53
7.32 Acidez y pH	58
8. Análisis de la microbiota bacteriana.....	66
8.1 Extracción ADN de la microbiota bacteriana de quesos Bola de Ocosingo.....	66
8.2 Amplificación de la región V3 del ADNr 16S y gen <i>rpoB</i>	67
8.3 DGGE y análisis digital de bandas: Región V3 del ADNr 16S y <i>rpoB</i>	69
8.4 Riqueza Específica: región V3 del DNAr 16S y <i>rpoB</i>	73
8.5 Dominancia Relativa: región V3 del DNAr 16S y gen <i>rpoB</i>	74
8.6 Análisis de agrupamiento UPGMA para las muestras analizadas con amplicones de la región V3 del DNAr 16S y del gen ribosomal <i>rpoB</i>	78
8.7 Selección del gen para el análisis de la microbiota bacteriana del Queso Bola de Ocosingo	85
8.8 Selección, escisión y reamplificación de ADN extraído de bandas individuales	88
8.9 Análisis de secuencias e Identificación de microbiota bacteriana	93
9. Análisis de las especies bacterianas identificadas en los Queso Bola de Ocosingo en los diferentes productores.	105
10. Comentarios finales.....	110
11. Conclusiones	111
12. Perspectivas del proyecto	112
13. Literatura citada.	113
14. ANEXOS	125

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Queso Bola de Ocosingo	14
Figura 2. Proceso de manufactura del queso Bola de Ocosingo.....	16
Figura 3. Diagrama de flujo de análisis de DGGE paralelo	24
Figura 4. Vector de Clonación pJet1.2/blunt.....	44
Figura 5. Valores de a_w de pasta de los quesos de diferentes productores	55
Figura 6. Valores de a_w del forro de los quesos de diferentes productores	58
Figura 7. Valores de acidez de pasta de los quesos de diferentes productores.....	59
Figura 8. Valores de acidez del forro de los quesos de diferentes productores.	61
Figura 9 Valores de pH de pasta de los quesos de diferentes productores	62
Figura 10. Valores de pH del forro de los quesos de diferentes productores	62
Figura 11. Análisis UPGMA de parámetros fisicoquímicos de queso Bola de Ocosingo	65
Figura 12. DNA total extraído de microbiota bacteriana de queso Bola de Ocosingo	67
Figura 13. Amplicones del gen 16S y <i>rpoB</i> del queso Bola de Ocosingo	69
Figura 14. Patrón de bandas y perfil digital del gen V3 16S.....	71
Figura 15. Patrón de bandas y perfil digital del gen <i>rpoB</i>	72
Figura 16. Dominancia relativa del perfil de bandas DGGE del gen V3 16S.....	75
Figura 17. Dominancia relativa del perfil de bandas DGGE del gen <i>rpoB</i>	77
Figura 18. Análisis UPGMA a partir de DGGE obtenido con el gen V3 16S	83
Figura 19. Análisis UPGMA a partir de DGGE obtenido con el gen V3 <i>rpoB</i>	84
Figura 20. Perfil DGGE de cepas bacterianas con <i>rpoB</i>	86
Figura 21. Bandas seleccionadas para secuenciar a partir e DGGE del gen <i>rpoB</i>	89
Figura 22. Amplicones del gen <i>rpoB</i> de las 40 bandas seleccionadas.....	90
Figura 23. Digestión de vector vacío y con inserto	91
Figura 24. Amplicones del gen <i>rpoB</i> de construcciones de clonación.....	92
Figura 25. Relación filogenética de bacterias Gram negativas.....	98
Figura 26. Relación filogenética de bacterias Gram positivas	100
Figura 27. Relación filogenética de bacterias Gram positivas	102
Tabla 1. Estudios de ecología microbiana realizados en quesos artesanales por DGGE	28
Tabla 2. Calidad microbiológica del queso Bola de Ocosingo	31
Tabla 3. Reactivos para PCR gen <i>rpoB</i>	37
Tabla 4. Condiciones óptimas para PCR gen <i>rpoB</i>	38
Tabla 5. Reactivos para PCR gen 16S.	39
Tabla 6. Condiciones óptimas para PCR gen <i>rpoB</i>	39

Tabla 7. Reactivos Kit CloneJET PCR Cloning.....	43
Tabla 8. Valores de a_w de la pasta y forro del Queso Bola de Ocosingo.	54
Tabla 9. Valores fisicoquímicos de muestras de quesos madurados mexicanos	56
Tabla 10. Valores de acidez y pH de pasta y forro de Queso Bola de Ocosingo.....	60
Tabla 11. Valores de concentración de ADN extraído de Quesos Bola de Ocosingo.....	66
Tabla 12. Valores de concentración de amplicones de PCR para gen 16S y <i>rpoB</i>	68
Tabla 13. Valores de riqueza específica y dominancia relativa de DGGE para 16S y <i>rpoB</i>	74
Tabla 14. Valores de índice de DICE para el gen 16S.....	79
Tabla 15. Valores de índice de JACCARD para el gen 16S	80
Tabla 16. Valores de índice de DICE para el gen <i>rpoB</i>	80
Tabla 17. Valores de índice de JACCARD para el gen <i>rpoB</i>	81
Tabla 18. Bandas seleccionadas para secuenciar.....	89
Tabla 19. Identificación de microbiota bacteriana a partir de DGGE	94
Tabla 20. Comparación de secuencias de <i>S. parasuis</i> del conjunto de muestras descartadas aisladas del queso Bola de Ocosingo comparadas con una cepa de referencia <i>S. parasuis</i> H35	104

Resumen

El queso Bola de Ocosingo es un alimento lácteo, fermentado y madurado, originario del municipio de Ocosingo en el Estado de Chiapas. Se caracteriza por ser elaborado a partir de leche cruda de vaca, mediante un proceso artesanal. Debido a que en la elaboración del queso Bola de Ocosingo no aplica ningún tratamiento térmico, es de nuestro interés conocer la composición de las comunidades bacterianas presentes y cómo están relacionadas a los parámetros fisicoquímicos como pH, acidez y a_w . Esto debido a que se ha observado que la microbiota bacteriana presente en alimentos fermentados, como los quesos madurados, podría tener un papel muy importante en el desarrollo de la inocuidad del producto, ya que algunas cepas tienen la capacidad de sintetizar sustancias con actividad antibacteriana, además de poseer propiedades funcionales y probióticas como lo son las bacterias ácido lácticas identificadas en los quesos y aplicaciones biotecnológicas que pueden ser utilizadas en diferentes tipos de alimentos fermentados. En comparación a estudios y evaluaciones realizadas en algunos quesos madurados elaborados con leche cruda, para el queso Bola de Ocosingo la información se considera escasa.

En esta investigación se realizó una comparación de los Quesos Bola de Ocosingo elaborados por ocho distintos productores de la región, en cuanto a sus características fisicoquímicas y la composición de la microbiota bacteriana. Los resultados evidenciaron que, entre los distintos productores del Queso Bola de Ocosingo, existen diferencias en cuanto al proceso de elaboración, principalmente en el tiempo de maduración. Las variaciones en el tiempo de esta etapa podrían explicar las diferencias en los valores de los parámetros fisicoquímicos de las muestras y, los resultados sugieren, que la composición de la microbiota bacteriana presente en los quesos de los diferentes productores, se explica por las similitudes de las características fisicoquímicas de los quesos. En un análisis de agrupamiento por UPGMA (método de grupos de pares no ponderados con media aritmética), se logró discernir tres grupos por similitud de las características fisicoquímicas. Como

las más similares se agrupó a quesos Laltic, La Peña y La Regional, en otro grupo a Dorados de la Selva, Ocosingo, Santa Rosa y Queshill y, finalmente, La Maya, como el queso menos parecido a los demás.

Esta investigación buscó identificar a la microbiota bacteriana dominante en el queso Bola de Ocosingo elaborado por distintos productores de la región, mediante la técnica molecular PCR-DGGE, la cual es independiente de cultivo. Para el análisis molecular de la microbiota bacteriana presente en el Queso Bola de Ocosingo, se estableció el uso del gen *rpoB*, el cual fue más útil, ya que el DGGE aportó una mayor información de dominancia y riqueza específica, además de que la identificación de los OTUs es posible a nivel de especie, comparado con el gen ADNr 16S, que únicamente permite la identificación a nivel de género. Se amplificaron fragmentos de los genes ADNr 16S y *rpoB*, esto con la finalidad de obtener un análisis más completo y complementario. A partir de los geles de DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante), se obtuvo información para conocer a los OTUs (Unidad Taxonómica Operativa) dominantes de muestras de queso de cada productor, mediante el cálculo de riqueza específica, dominancia e intensidad relativa promedio. Del patrón de bandas se seleccionaron algunas bandas de interés de cada productor, las cuales fueron secuenciadas a fin de conocer su identidad. Se logró identificar como microorganismos dominantes a *Streptococcus parasuis*, especie presente en todos los productores y *Serratia marcescens*, especie presente en el queso de los productores Ocosingo, Laltic y Queshill. Las especies no dominantes identificadas pertenecen a *Lactiplantibacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus infantarius*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter bugandensis*. De acuerdo con la presencia de estas especies en los quesos de distintos productores, se encontraron dos grupos definidos: quesos Laltic, Ocosingo y La Regional y en otro, a La Maya y Dorados de la Selva. Los quesos restantes no se agruparon con ninguno de los anteriores.

Si bien, la microbiota identificada en el queso Bola de Ocosingo se ha reportado en otros quesos artesanales, madurados, del mundo, la presencia de proteobacterias

no es deseable, por lo que se recomienda mejorar las prácticas de elaboración de este queso.

1. Introducción.

1.1 Quesos

Los quesos son productos elaborados de leche, que puede estar estandarizada y/o pasteurizada, obtenida de cabra, oveja, vaca y otros rumiantes, que se obtiene a partir de la coagulación de las proteínas de la leche, principalmente la caseína. En general, los ingredientes mínimos necesarios para su elaboración son la leche, cuajo y sal, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado (NOM-243-SSA-1-2010). Su elaboración involucra las etapas de cuajado, cortado, desuerado, salado y moldeado. Los quesos son productos alimenticios de gran importancia para el hombre por sus cualidades nutritivas y sensoriales. Es considerado como un alimento nutritivo, además de ser una buena fuente de ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales. La cantidad de grasa que contiene determina un importante aporte energético y varía con base en la concentración de la grasa presente en la leche empleada para su elaboración (Caro, *et al.*, 2014).

En México, existe una clasificación de quesos de las que se derivan tres grandes grupos (Villegas de Gante & Huerta, 2015). Esta clasificación está basada en diversos criterios, tales como la escala de producción, algunas características como el tipo de pasta, la consistencia de la pasta, el grado de maduración, la forma de coagulación, el contenido de materia grasa, etcétera. Aunque esta clasificación es arbitraria, ayuda a agrupar sistemáticamente quesos que son similares en ciertas características básicas; por ejemplo, dentro de esta clasificación, existen algunos quesos genuinos que son elaborados artesanalmente. Una de las principales características en el proceso de elaboración de algunas variedades artesanales, es que la leche utilizada no incluye algún proceso térmico que reduzca la microbiota presente, ni inóculos iniciadores,

por lo que la microbiota nativa es la responsable de sus características organolépticas (Centeno-Rodríguez, *et al.*, 2020).

1.2 Quesos Artesanales Mexicanos

Un queso artesanal se define como un producto con una raíz histórica que se remonta a décadas o siglos. En su elaboración se incluyen técnicas que se han heredado de generación en generación y con uso de materia prima e insumos originales de las regiones de producción (Falardeau, *et al.*, 2019).

En México, se presenta la elaboración de quesos tradicionales cuyo consumo forma parte principalmente de la cultura de alimentación entre los mexicanos desde la época colonial. Los quesos artesanales se consideran originales y genuinos, están relacionados a las condiciones sociales, culturales y de disponibilidad local de recursos naturales. La producción tradicional de queso ha tomado un gran impulso en distintas entidades, se ha convertido en una actividad complementaria de la ganadería y ha incrementado su importancia como una actividad económica principal. En México, la producción de quesos representa una actividad sustentable y se estima que existen aproximadamente 40 variedades (Cesín-Vargas, 2014), de los cuales 17 son elaborados de manera tradicional, 4 son tradicionales e industriales y el resto son industriales (López, 2014).

Los quesos tradicionales son el resultado de las condiciones ecológicas como: el clima de la zona donde se producen, la raza de los animales productores de leche, el tipo de flora con la que éstos se alimentan, la manera en que es manejada la leche cruda, la microbiota natural de la leche, el uso y tipo de cuajo, la tecnología utilizada para la elaboración del queso, el tiempo y forma de maduración y del conocimiento tradicional del territorio donde son elaborados. Por su nivel, volumen de producción y tecnología aplicada, los quesos tradicionales mexicanos se han elaborado en pequeña escala con tecnología tradicional, sin muchos controles de calidad y con limitado alcance en el mercado. Generalmente, son de circulación

local o regional, tienen como nichos de mercado a consumidores del mismo espacio geográfico. Entre los quesos tradicionales madurados más conocidos a nivel nacional están: El queso Cotija, Oaxaca, Asadero, Poro de Tabasco, Adobera, Bola de Ocosingo, entre otros; lo anterior indica el potencial biotecnológico de quesos artesanales que tiene México para dar a conocerlos por medio de investigaciones científicas (Villegas, *et al.*, 2016).

1.3 Queso Bolade Ocosingo

El Queso Bola de Ocosingo se considera un queso original y único dentro de los quesos madurados tradicionales mexicanos. Es originario del municipio de Ocosingo, Estado de Chiapas, ubicado a 16° 54' 21'' latitud norte y 92° 5' 30'' longitud oeste, a una altitud que oscila entre 500 y 1500 msnm. Fisiográficamente, el municipio de Ocosingo se localiza en la región de las Montañas de Oriente, y Selva Lacandona, al este del estado. El terreno está integrado por varias serranías paralelas constituidas por rocas calizas y areniscas. La vegetación es muy abundante, muy propia de la Selva subtropical con una rica biodiversidad; en cuanto a los climas se han registrado: cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (62.10 %); cálido subhúmedo con lluvias en verano (12.38 %); semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano (12.27 %); cálido húmedo con lluvias todo el año (11.17 %). La precipitación se ubica entre 1500 mm y 3400 mm por año, mientras que la temperatura media anual se sitúa entre 18 y 28 °C (INEGI, 2020).

El Queso Bola es un producto elaborado por algunos queseros artesanales, cuyo conocimiento se basa en un *saber-hacer* tradicional que ha pasado por tradición oral y práctica de generación en generación. La originalidad del queso Bola de Ocosingo se atribuye a su peculiar presentación, proceso de elaboración e historia (Agudelo-López, *et al.*, 2019). Se presenta en forma de Bola rígida, con un diámetro de entre 8 y 12 cm y con un peso aproximado de entre 500 y 1000 g (Figura 1). Está formado por dos tipos de quesos, uno dentro de otro. Su elaboración puede dividirse en dos fases: la elaboración de la pasta del núcleo por cuajado mixto (láctico-enzimático) y la elaboración de la corteza o forro derivada de una cuajada de pasta

hilada hecha con leche totalmente descremada. La elaboración del Queso Bola se realiza durante un lapso mayor a las tres semanas (21 días), ya que es necesario madurar la pasta del núcleo por ese tiempo a temperatura ambiente, antes de colocarle el forro. Finalmente, el queso del núcleo se compacta a mano en forma de Bola y se cubre por dos capas sucesivas del queso de pasta hilada, la cual es rica en caseína, que, al enfriarse y orearse, se endurece y funciona como cubierta protectora que envuelve un núcleo de pasta elaborada, semejante a la del queso crema de Chiapas (García, 2018).

Es elaborado con leche cruda de un sistema extensivo en libre pastoreo de ganado de doble propósito, el 60 % de los ranchos poseen razas de ganado suizo americano y 40 % tienen cruces de cebú y pardo suizo. La producción de leche por rancho se ubica entre los 30 y 500 litros por día. Esta producción cambia estacionalmente, en época de lluvias es mayor que en la de sequía. La leche cruda con la que se elabora el queso contiene alrededor de 3.2% de proteína y el 3.9% de grasa, la proporción de estos componentes propicia la distinción de la calidad sensorial de la leche y por consecuencia del queso (Cesín-Vargas, 2014).



Figura 1. Queso Bola de Ocosingo analizados en este estudio.

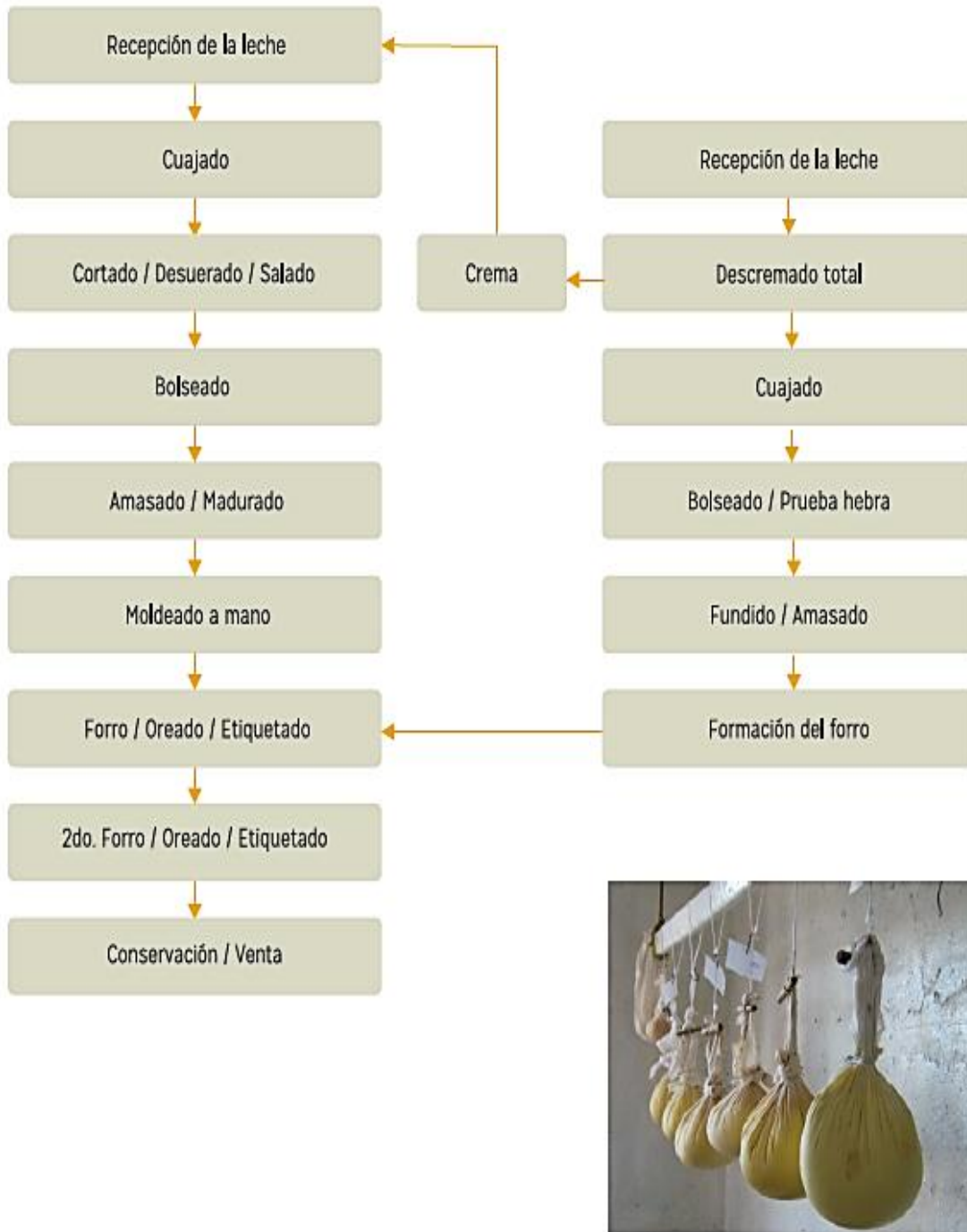
1.3.1 Proceso de manufactura

Entre los pasos notables en el proceso de elaboración de este queso artesanal de leche cruda, se destacan los siguientes (Figura 2):

1. **Recepción.** La leche cruda es recibida en la quesería y es depositada en un bote. Por cada 100 L de leche se adiciona 4 kg de crema y se agita.
2. **Cuajado y reposado.** La leche se reposa por 2 h y se añade cuajo puro de ternera de fuerza 1 a 10,000 (1 litro de cuajo para 10.000 litros de leche a 35°C

en 40 minutos) en cantidad de 2.5 a 5 mL por cada 100 L. Se deja cuajando en reposo de 24 horas.

3. **Cortado, desuerado y salado.** Se corta la cuajada con lira o cuchillo y con una coladera se transfiere a bolsas de tela y se deja desuerar. Se coloca la bolsa a escurrir durante 3-4 h y se añade sal fina en proporción 3-4 % (p / p). El desuerado puede ser acelerado colocando la bolsa de tela en una prensa durante 24 h o dejarla colgada.
4. **Amasado y madurado.** Al tercer día, se descuelga la bolsa y se amasa la cuajada uniformemente. Se coloca en otra manta limpia en forma de Bola, se amarra y se vuelve a colgar para desuerar. Este paso se repite por 21 días.
5. **Moldeado.** Porciones de unos 500 g o más se moldean, compactándolas con las manos, impartiendoles la forma casi esférica característica.
6. **Forrado.** Las Bolas son forradas con 2 sucesivas capas de cuajada “hilada” y caliente elaborada con leche completamente descremada. Este material, rico en caseína, al enfriarse y oreadse, se endurece y funciona como un verdadero empaque protector (Villegas de Gante, *et al.*, 2014). La crema que se obtiene de esta etapa es la que se agrega en el paso 1.



**Figura 2. Proceso de manufactura del Queso Bola de Ocosingo.
Tomada de Villegas De Gante, et al., 2014.**

1.4 Diversidad de la Microbiota de los Quesos artesanales

Es indispensable conocer qué microorganismos se establecen en un queso durante su proceso de elaboración, así como qué comunidades microbianas contribuyen a desarrollar aquellas características distintivas y únicas dentro de los quesos artesanales mexicanos, esto debido a su potencial biotecnológico. Además, se debe investigar sobre las posibles especies que podrían estar involucradas en la inhibición de ciertas bacterias patógenas y coadyuvar a extender su vida útil (Chávez-Martínez, *et al.*, 2019).

El uso de leche cruda en quesos artesanales sugiere la presencia de microorganismos relacionados en la inocuidad y las características organolépticas distintivas del queso. La microbiota desarrollada en los quesos se considera diversa comparada con los distintos alimentos fermentados. Funcionan como sistemas complejos que se caracterizan por la presencia, interacción y dinámica de bacterias, incluso también de hongos y levaduras. Es así como se han identificado más de 150 especies microbianas, con diferentes balances cualitativos y cuantitativos en términos de especies y cepas que varían entre los diferentes tipos de leche (Fox, *et al.*, 2017). Se ha determinado principalmente el desarrollo de bacterias ácido lácticas iniciadoras y de microbiota secundaria (Brito, 2020).

1.4.1 Bacterias ácido lácticas iniciadoras

Las bacterias ácido lácticas (BAL) iniciadoras son preparaciones de microorganismos vivos, inoculados intencionalmente con el fin de hacer uso de su metabolismo microbiano, principalmente utilizados en la industria alimentaria. Están involucradas en la producción de ácido láctico durante la elaboración del queso, el que funge como único o principal producto de fermentación, además, pueden sintetizar diversos compuestos que presentan actividad antimicrobiana usados para la bioconservación (Liu, *et al.*, 2019). Los principales géneros de las BAL son: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Wiesella* (Fox *et al.*, 2017). Es

importante destacar que, aunque al queso Bola de Ocosingo no se adiciona un cultivo iniciador, la ausencia de un proceso térmico permite la participación de BAL nativas de la leche (Sánchez, 2016).

Los cultivos iniciadores también pueden tener un papel importante durante la maduración, debido fundamentalmente a la producción de compuestos aromáticos a partir de la lactosa, el citrato, proteínas y los péptidos de la leche, además de contribuir en la textura, como consecuencia de la degradación de las proteínas y grasas (Carafa, *et al.*, 2019). Así, los aminoácidos originados por la degradación de las proteínas servirán como precursores para la formación de compuestos volátiles responsables en gran parte de las características organolépticas del queso (Battelli, 2019). Representan un grupo muy heterogéneo que, conforme a sus características fisiológicas, son tolerantes al ácido como consecuencia obligada de su metabolismo y son capaces de producir ácido suficiente para reducir rápidamente el pH de la leche (Gobbetti, *et al.*, 2018).

1.4.2 Microbiota secundaria

Ésta no contribuye importantemente a la producción de ácido en el queso y son incorporadas involuntariamente (Cotter & Beresford, 2017). Estas bacterias toleran un ambiente hostil y junto con las bacterias iniciadoras desempeñan un papel importante en procesos bioquímicos que ocurren durante el proceso de maduración. Se encuentran en bajas concentraciones inicialmente, sin embargo, pueden aumentar sus concentraciones en poco tiempo (Settanni & Moschetti, 2010).

Se considera que esta microbiota determina las características organolépticas de los quesos, de esta manera se puede considerar que la presencia de estos microorganismos es deseable (Bockelmann, 2010). Sin embargo, algunos productores consideran de mayor complejidad controlar esta microbiota debido a que es sumamente variable, desde las diferentes queserías, así como, entre quesos producidos en la misma quesería y, por ende, repercuten en las características

finales distintivas de cada producto. Entre los principales géneros involucrados se encuentra *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Propionbacterium* y *Pediococcus*.

1.4.3 Bacterias patógenas

Las infecciones asociadas al consumo de quesos y productos lácteos representan alrededor del 5% de las enfermedades transmitidas por alimentos. Estos microorganismos patógenos principalmente están involucrados en un proceso de contaminación de los productos. Entre los distintos factores que propician ciertos medios de contaminación, se suelen atribuirse a las malas prácticas de manufactura durante la elaboración del alimento, un ordeño insalubre o bien por contaminación debido a los operarios (Moraes, *et al.*, 2009).

En los quesos madurados los principales patógenos son *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* pues, aunque presentan una incidencia bastante baja, son responsable de las infecciones más severas que pueden transmitir los productos lácteos. También se ha reportado la presencia de otros microorganismos como *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Shigella* y *Brucella sp.* (Kousta, *et al.*, 2010).

1.5 Factores que determinan el crecimiento de microorganismos

Cada paso desarrollado durante el proceso de elaboración de un queso es determinante para conseguir las características finales esperadas de cada variedad. Las diferencias en la realización de los procesos, así como las distintas materias primas empleadas, establecen ciertas condiciones selectivas para el establecimiento, crecimiento y supervivencia de algunos microorganismos durante el procesamiento y maduración del queso. La elaboración de la mayoría de las variedades de queso, requieren de un proceso de coagulación de la leche a temperatura ambiente, la cual funciona como un factor crítico que facilita el crecimiento de la mayoría de los microorganismos (Montel, *et al.*, 2014).

El alcanzar las cualidades fisicoquímicas que distinguen a un queso depende del proceso de manufacturación del producto, así como para el desarrollo de la microbiota durante su elaboración y que, a su vez, determinan las características particulares que posee cada variedad de queso. Las variaciones en factores tales como el contenido y actividad de agua (a_w), concentración de sal, pH y potencial redox, influyen en el crecimiento y supervivencia de microorganismos en los quesos (Beresford, *et al.*, 2017), estos son parámetros determinantes que permiten la proliferación o inhibición de microorganismos.

La descripción de la microbiota de un queso debe considerar la dinámica de las comunidades microbianas durante las diversas fases de la producción de los quesos. Esto permitirá la comprensión de la base de rasgos sensoriales específicos y de sus variaciones estacionales. Cuando un queso es puesto a un proceso de maduración, este involucra cambios a nivel bióticos y abióticos que influyen drásticamente en la microbiota presente. Existe una pérdida de humedad, hay un aumento de acidez debido al desarrollo y actividad microbiana que, a su vez, inhibe el crecimiento de otros microorganismos como los coliformes, cuya cantidad disminuye totalmente poco después de los 50 días de haber sido elaborado el queso (Özcan, *et al.*, 2021).

Por otro lado, durante la maduración de quesos ocurren numerosas reacciones bioquímicas, sobre las proteínas, la materia grasa y la lactosa, responsables de importantes cambios en la textura y en las características sensoriales, que conducen a determinar la tipicidad de cada producto. Dentro de los procesos bioquímicos se incluyen la proteólisis, lipólisis y la glucólisis. La proteólisis es el principal y más complejo de estos eventos y en muchas variedades de quesos, el evento bioquímico más importante durante la maduración. El patrón de la proteólisis se puede resumir de la siguiente manera: las caseínas son hidrolizadas inicialmente por la actividad residual del coagulante retenido en la cuajada y por la plasmina, además de otras enzimas proteolíticas nativas, en una serie de péptidos de tamaño

intermedio, que son hidrolizados por proteasas y peptidasas de las bacterias ácido lácticas iniciadoras, BAL no iniciadoras y por la microbiota secundaria (Gobbetti, *et al.*, 2018).

En las últimas décadas, debido al uso de nuevas técnicas moleculares el conocimiento acerca de la diversidad de los ecosistemas microbianos se ha incrementado sustancialmente. Ahora, estas herramientas están disponibles para conocer la diversidad y dinámica de las comunidades microbianas involucrada en los procesos que intervienen en la elaboración de distintos alimentos (Ramezani, *et al.*, 2017).

1.6 Métodos para identificación de microorganismos

1.6.1 Técnicas dependientes de cultivo (TDC) e independientes de cultivo (TIC)

Entre las principales estrategias para determinar la microbiota presente en los productos lácteos, está el uso de técnicas dependientes de cultivo (Pino, *et al.*, 2018). Sin embargo, estos métodos poseen ciertas desventajas debido a que sólo permiten la identificación de cepas que pueden ser cultivadas solo si sus necesidades metabólicas y fisiológicas pueden ser reproducidas *in vitro*. En contraste con los métodos dependientes de cultivo, los métodos independientes de cultivo tienen por objeto proporcionar una imagen de las comunidades microbianas, sin la necesidad de aislar sus componentes individuales (Greppi, *et al.*, 2015).

El desarrollo de métodos moleculares para el entendimiento de las comunidades microbianas en productos lácteos ha transformado la ecología microbiana del queso. Proporciona información concreta sobre las comunidades microbianas, la evolución y la naturaleza de los grupos durante la maduración del queso (Chombo-Morales, *et al.*, 2016). Existen enfoques moleculares, especialmente aquellos basados en el uso de rRNA y ADN, que han permitido analizar comunidades complejas con base en la diversidad de secuencias nucleotídicas, permitiendo

analizar a las comunidades presentes en ecosistemas naturales, incluso aquellas especies que no son cultivables. Entre las principales técnicas se encuentran: polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP), polimorfismo conformacional de una sola hebra (SSCP), secuenciación masiva, electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y las técnicas relacionadas, electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) y electroforesis en gel con gradiente de temperatura temporal (TTGE). Todas ellas han sido aplicadas en ecología microbiana para resolver diferencias hasta de un solo nucleótido en secuencias de regiones previamente amplificadas del gen DNAr 16S, mediante PCR. Estas técnicas representan métodos rápidos, fiables, reproducibles y eficaces para la detección e identificación de los microorganismos presentes en los productos lácteos (Roselló-Soto, *et al.*, 2018).

1.6.2 DGGE: Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturizante

Los nuevos enfoques moleculares basados en análisis directos de ADN (o ARN) en su entorno, sin enriquecimiento microbiano, han permitido descripciones más precisas de las comunidades microbianas en ecosistemas complejos. Uno de los métodos más desarrollados es la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante DGGE (Nalepa, *et al.*, 2017).

DGGE es una de las técnicas más utilizadas en microbiología molecular para el estudio de ecología microbiana de diferentes ecosistemas alimentarios. La técnica DGGE es una variante de electroforesis que realiza la separación de fragmentos de ADN que presentan un mismo tamaño, pero con secuencia nucleotídica diferente. Requiere de un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturizantes del ADN (principalmente se utiliza una mezcla de urea y formamida) la cual se incorpora a lo largo de un gel de poliacrilamida. Durante la electroforesis, se mantiene una temperatura constante de 50-65 °C y los fragmentos de ADN de doble cadena migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración de urea y formamida (concentración desnaturizante) a la cual las cadenas se separan

localmente y el desplazamiento de las moléculas disminuye o se interrumpe. La concentración del agente de desnaturalización que permite que las cadenas de ADN se separen localmente, depende de la secuencia de nucleótidos, es decir, del contenido de GC (triples puentes de hidrógeno). Así, fragmentos de ADN con secuencias nucleotídicas diferentes, tendrán diferentes posiciones en el gel (Nalepa & Markiewicz, 2017). Las bandas o unidades taxonómicas operacionales (OTUs) visibles en geles DGGE, representan los componentes de la microbiota, las cuales, pueden ser reamplificadas y secuenciadas a fin de conocer las especies microbianas presentes en el alimento.

El uso de esta técnica, además de proveer un perfil microbiano de un sistema alimentario, también posibilita observar de forma sencilla la dinámica de las comunidades microbianas a lo largo del tiempo, al poderse comparar fácilmente el perfil electroforético en diferentes tiempos (Aquilanti, *et al.*, 2016). Se emplean cebadores con una grapa rica en GC (de aproximadamente 35 a 40 nt) fusionado en el extremo 5' de uno de ellos, la cual permite alcanzar la desnaturalización parcial para que las 2 cadenas no se disocien completamente en el gel (Figura 3).

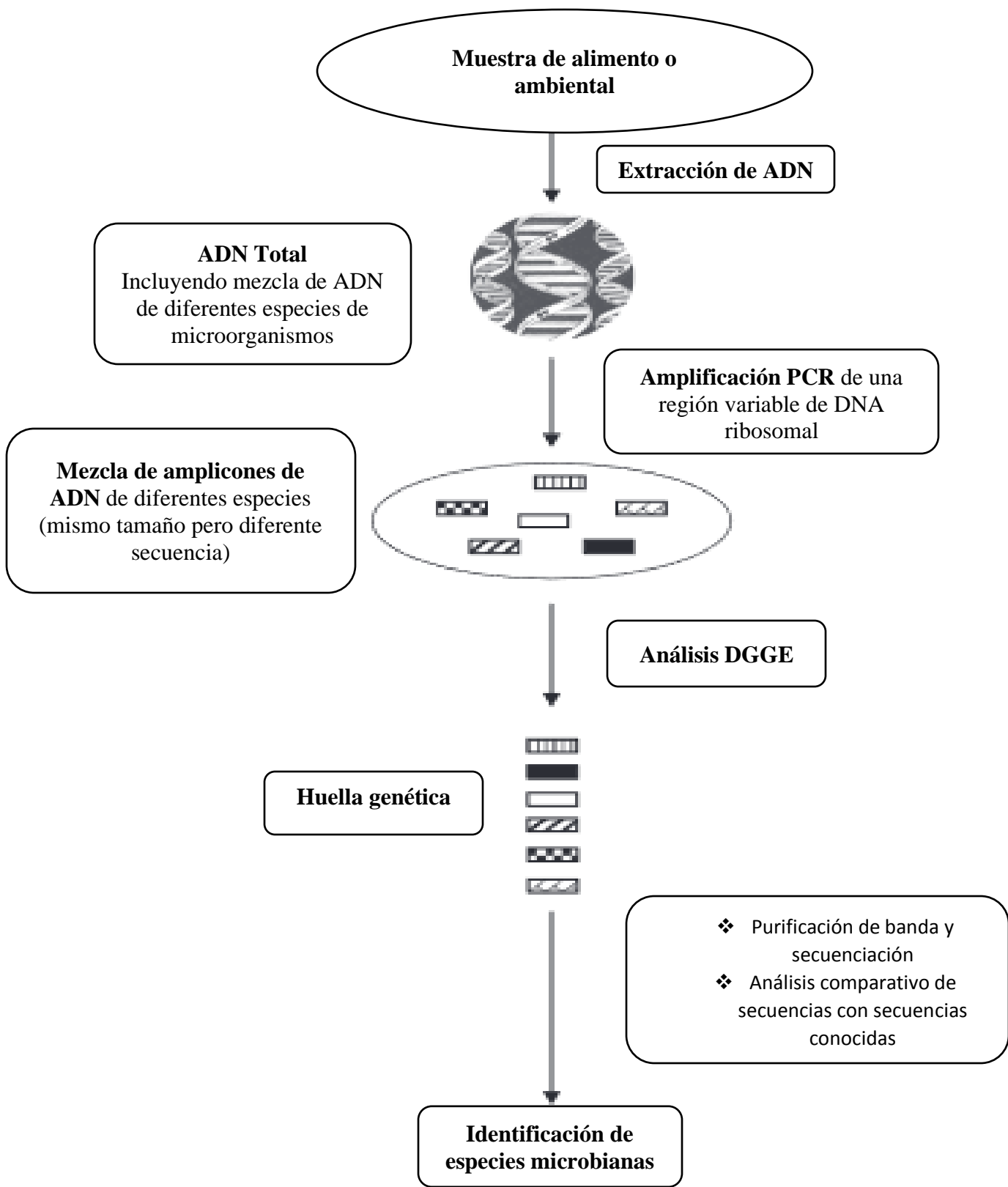


Figura 3. Diagrama de flujo de análisis de DGGE paralelo (Tomado de Ercolini, 2004)

La técnica DGGE previamente descrita, requiere la amplificación de regiones del genoma que aporten información taxonómica, estén relativamente conservadas y distribuidas en forma universal. Entre estos marcadores moleculares, destaca el gen que codifica para el gen DNAr 16S, asociado a la subunidad ribosomal pequeña que está universalmente distribuido y es muy conservado entre las especies de procariotas. El producto de este gen es un ARNr de aproximadamente 1500 pb, a partir de los análisis con este gen se puede obtener valiosa información sobre las relaciones filogenéticas entre seres vivos y, de esta manera es posible clasificarlos (Duarte *et al.*, 2012). Esta región tiene suficiente variación de la secuencia (polimorfismo) entre géneros bacterianos que estén estrechamente relacionados, permitiendo diferenciarlos mediante la aplicación de la técnica DGGE (Lv, *et al.*, 2017).

Por otra parte, el uso del gen *rpoB* es también ampliamente utilizado para el análisis de la microbiota bacteriana. La ARN polimerasa es una enzima crucial en el proceso transcripcional, en las bacterias, es responsable de sintetizar mRNA, rRNA y tRNA. Su núcleo consiste en 5 subunidades, incluyendo un dímero α (α_2), una subunidad β , una subunidad β' y una subunidad π . Estas subunidades son convertidas en una holoenzima después de la unión de un factor sigma, que es codificada por el gen *rpoB*. El tamaño del *rpoB*, esta entre 3411 pb y 4185 pb. Uno de los problemas para ser utilizado como gen blanco en distintos estudios taxonómicos, es que no existe una base de datos suficientemente amplia (Ogier, *et al.*, 2019).

1.6.3 Ventajas y desventajas de la técnica DGGE

En sus inicios, la técnica de DGGE se usaba principalmente para la detección de mutaciones puntuales en seres humanos; sin embargo, posteriormente se extendió al estudio de comunidades microbianas. La DGGE ha sido utilizada para estimarla complejidad de comunidades microbianas de diversas biopelículas (Muyzer *et al.*, 1993). Hasta el momento se han publicado una gran cantidad de artículos sobre comunidades microbianas, en los cuales se ha utilizado la técnica DGGE para

estudiar la ecología marina (Schäfer & Muyzer, 2001), la diversidad bacteriana en suelos tropicales (Peixoto, *et al.*, 2002). Incluso, se han comparado las comunidades presentes en los diferentes perfiles de un mismo suelo (Agnelli, *et al.*, 2004). De la misma forma, esta técnica ha sido ampliamente utilizada en la industria alimenticia para la identificación de microorganismos patógenos en los distintos alimentos (Ercolini, 2004).

La técnica de DGGE presenta grandes ventajas entre las distintas técnicas independientes de cultivo para el análisis de microbiota bacteriana, como lo es tiempo y costos de análisis; podemos destacar principalmente su gran sensibilidad para detectar heterocigotos cuando se estudian mutaciones y también para diferenciar a los individuos presentes en una comunidad, con lo que se puede aplicar en estudios de comunidades microbianas (Duarte, *et al.*, 2012).

Entre las ventajas relacionadas con su uso, también podemos destacar que la técnica de DGGE es relativamente rápida en cuanto a la generación de resultados (aproximadamente 24 horas desde el momento en que se han obtenido los productos de PCR); además, no requiere del cultivo previo de los microorganismos, ni tampoco requiere información previa acerca de la composición de especies de la comunidad analizada. Los resultados pueden ser analizados en forma cualitativa y cuantitativa, permitiendo además analizar de manera simultánea varias muestras, lo que permite utilizar la técnica para examinar series temporales y dinámicas de las poblaciones microbianas (Muyzer, *et al.* 1993).

Alguna de las desventajas que se presentan al momento del análisis de DGGE es la presencia de artefactos como bandas inespecíficas, cuya generación se da durante la amplificación de las cadenas de ADN en la técnica de PCR, lo que ha resultado un grave problema para los análisis de diversidad genética, se reconoce que este fenómeno se da por errores en la Taq polimerasa al momento de la amplificación (Janse, *et al.*, 2004). Así también la presencia de bandas heteroduplex pueden llegar a sesgar la investigación al ser tomados en cuenta para cuantificar la

abundancia y/o diversidad de las comunidades microbianas estudiadas (Neilson, *et al.*, 2013). La presencia de moléculas heteroduplex en las muestras amplificadas por PCR cuyo material aún no es conocido, complica la interpretación de los resultados (Thompson, *et al.*, 2002). Cuando la técnica de PCR se utiliza para analizar diversidad genética presente en una comunidad de ADN, las moléculas heteroduplex podrían representar una gran fracción en el producto final (Janse, *et al.*, 2004). No existe alguna explicación exacta referente a la presencia de estas bandas, pero puede deberse que durante cada ciclo de PCR algún producto secundario se forma debido a la detención prematura de la elongación, además de las combinaciones particulares de los fragmentos de genes y cebadores.

Asimismo, se ha observado un fenómeno denominado microheterogeneidad intragenómica en la secuencia del ADNr 16S en genomas bacterianos, por lo que varias bandas provenientes de la misma especie migrarán diferencialmente en un análisis de PCR-DGGE. La heterogeneidad intraespecie produce la presencia de múltiples copias del gen ribosomal, resultado de una evolución diferencial. 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).

La técnica DGGE ha sido ampliamente utilizada por los microbiólogos en alimentos con el objetivo de conocer la diversidad y dinámica microbiana en alimentos lácteos fermentados mexicanos (Tabla 1).

Tabla 1. Algunos estudios de ecología microbiana realizados en diferentes quesos madurados mexicanos mediante la técnica DGGE

Tipo de Queso	Gen blanco	Microorganismos identificados	Referencia
Queso Bola de Ocosingo	<i>rpoB</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Serratia marcescens</i> y <i>Lactococcus garvieae</i>	Linares, 2022.
	16S	<i>Streptococcus</i> spp, <i>Enterobacter</i> spp, <i>Escherichia</i> spp, <i>Serratia</i> spp, <i>Acinetobacter Iwoffii</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Linares, 2022.
Chihuahua	Región V3 16S	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Sánchez, 2016.
Poró de Balancán	Región V3 16S	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> Enterobacterias: <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella</i> sp, <i>Salmonella</i>	de la Rosa, 2013.
Cotija	Región V3 16S	<i>Vagococcus</i> sp, <i>Bacillus</i> sp, <i>Virgibacillus pantothenicus</i>	Casillas, 2013.
	<i>rpoB</i>	<i>Staphylococcus equorum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus infantarius</i> , <i>Streptococcus suis</i>	Casillas, 2013.
	Región V3 16S	<i>Enterococcus</i> , <i>Marinilactibacillus</i> , <i>Vagococcus</i>	Zuñiga, 2009.
	Región V3 16S	<i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Carnobacterium</i>	Chombo-Morales, 2016.

1.7 Antecedentes: Análisis microbiológico del Queso Bola de Ocosingo

Los quesos artesanales madurados son considerados ecosistemas microbianos medianamente complejos, representados por alguno o varios de los siguientes grupos: bacterias ácido lácticas, bacterias no ácido lácticas, levaduras y mohos. Las fermentaciones dan lugar a características relacionadas a la calidad sensorial, cualidades nutritivas y propiedades probióticas. El comercio de quesos artesanales

elaborados a partir de leche cruda en México resulta restringido, debido a razones económicas, de vías de transporte, costos de envío a zonas de abasto, etc. Por otra parte, también es escasa la información sobre la composición microbiana en estos productos. Incluso son escasas las normas que los regulan, entre las que se encuentran la Norma Oficial Mexicana de queso Oaxaca, la Norma Mexicana del Cotija artesanal madurado y los proyectos de Norma Mexicana de queso Poro de Balancán y Bola de Ocosingo (PROY-NMX-F-767-COFOCALEC-2019, PROY-NMX-F-768-COFOCALEC-2019, NMX-F-735-COFOCALEC-2018, NMX-F-733-COFOCALEC-2013). Por otro lado, las investigaciones sobre la microbiota de quesos artesanales, indican que estos productos están dentro del rango establecido en las normas para bacterias patógenas e incluso la microbiota benéfica es mayor que en cualquier otro queso comercial (Escobar, *et al.*, 2012).

López (2013) realizó el análisis microbiológico del Queso Bola de Ocosingo y no encontró *E. coli* en las muestras analizadas y esto coincide con estudios de calidad microbiológica del Queso Bola durante tres tiempos de maduración 50, 80 y 100 días (Escobar, *et al.*, 2012), donde observaron que las poblaciones de los grupos microbiológicos determinados fueron disminuyendo durante la maduración, hasta llegar a una cantidad de coliformes y *E. coli* <3 NMP g^{-1} . Además, no se detectó la presencia de *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella* en ninguna muestra evaluada. Los resultados anteriores muestran que el queso Bola de Ocosingo cumple con la norma NOM-243-SSA1-2010, donde se especifica un límite máximo de 10 NMP g^{-1} para *E. coli* y la ausencia de microorganismos patógenos para quesos madurados.

Así mismo, en el grupo de trabajo se han realizado análisis microbiológicos estándar en el queso Bola de los diferentes productores de la región de Ocosingo (Méndez, 2022 y Neri, 2022). Sobre las mismas muestras que se utilizaron en el presente trabajo, se realizó la cuenta de mesófilos aerobios, mohos, levaduras, *S. aureus*, coliformes totales y *E. coli*, de cada productor se compararon dos unidades de muestreo (NOM-243-SSA1-2010) (Tabla 2). De todos los productores evaluados,

la cuenta obtenida de mesófilos aerobios resultó ser muy alta y la de levaduras no cumple con los parámetros establecidos en la NOM-243-SSA1-2010. Esto se puede atribuir a que la misma no incluye a los quesos artesanales elaborados con leche cruda. El uso de leche cruda como materia prima da lugar al desarrollo de características organolépticas únicas por la microbiota nativa de la leche, esto explica la razón por la que las cuentas de mesófilos y levaduras son altas. Se observó que la cuenta de microorganismos coliformes totales en algunos productores, como Dorados de la Selva, La Peña y La Regional, no cumplen con la normatividad mexicana, que establece un valor de ≤ 100 UFC/g. El contacto de la materia prima directo con las manos de los productores, así como las condiciones de ordeño resultan una fuente importante de contaminación de coliformes, ya que los corrales no suelen estar pavimentados lo que podría originar la contaminación (Cervantes, *et al.*, 2006).

Para la cuenta de *S. aureus* se observó que, en algunos productores como La Maya, y La Regional no cumplen con la normatividad mexicana que establece un valor de ≤ 100 UFC/g. La presencia de algunos patógenos como *S. aureus*, es posible ya que el microorganismo puede llegar a habitar en la ubre y tetillas de vacas que tienen mastitis, además de una inadecuada calidad higiénica y sanitaria durante la ordeña. Respecto a la cuenta de *E. coli*, resultó ser el parámetro que cumple con los valores establecidos en la NOM-243-SSA1-2010, se determinó la ausencia de este microorganismo en los quesos de todos los productores. Para mejorar la calidad microbiológica del queso es indispensable considerar que, al utilizar leche no pasteurizada durante el proceso de elaboración, la implementación de técnicas estandarizadas como el cuidado en uso de utensilios para la manipulación de la materia prima podría disminuir la cuenta de mesófilos aerobios y levaduras en gran cantidad (Velázquez-Ordoñez *et al.*, 2019). Se recomienda mejorar las condiciones de ordeño para evitar contaminación directa en la leche.

Tabla 2. Calidad microbiológica del queso Bola de Ocosingo (Méndez, 2022; Neri, 2022)

Productor	Bola	Mesófilos aerobios UFC/g	BAL UFC/g	Mohos UFC/g	Levaduras UFC/g	S. aureus UFC/g	Coliformes totales UFC/g	E. Coli UFC/g
Laltic	1	74 x 10 ⁴	95 x 10 ⁴	<10	26 x 10 ⁵	<10	<10	<10
	2	67 x 10 ⁴	10 x 10 ⁵	<10	19 x 10 ⁵	<10	<10	<10
La Regional	1	69 x 10 ⁴	45 x 10 ⁴	<10	<10	<10	<10	<10
	2	65 x 10 ⁴	36 x 10 ⁴	<10	17 x 10 ⁴	60 x 10 ² VE	1 x 10 ³ VE	<10
La Peña	1	11 x 10 ⁴	42 x 10 ²	<10	12 x 10 ³	20 VE	30 x 10 ²	<10
	2	95 x 10 ³	18 x 10 ²	<10	30 x 10 ¹	<10	<10	<10
Queshil	1	23 x 10 ⁵	----	<10	34 x 10 ⁵	<10	<10	<10
	2	84 x 10 ⁴	----	<10	47 x 10 ⁵	<10	<10	<10
La Maya	1	22 x 10 ⁵	----	<10	1 x 10 ⁴ VE	10 x 10 ³	<10	<10
	2	18 x 10 ⁵	----	<10	14 x 10 ⁴	<10	<10	<10
Santa Rosa	1	27 x 10 ⁵	----	<10	17 x 10 ⁵	<10	<10	<10
	2	44 x 10 ⁶	----	<10	10 x 10 ⁵	<10	<10	<10
Bola de Ocosingo	1	6 x 10 ⁶	----	<10	40 x 10 ³ VE	100	<10	<10
	2	12 x 10 ⁷	----	<10	10 x 10 ⁴	<10	100	<10
Dorados de la Selva	1	15 x 10 ⁶	----	<10	27 x 10 ⁴	<10	<10	<10
	2	17 x 10 ⁶	----	<10	21 x 10 ⁴	<10	20 x 10 ² VE	<10
NOM-243-SSA1-2014		----	----	500	500	≤100	≤100	100

VE=valor estimado

En cuanto a un análisis molecular de la microbiota presente en el Queso Bola de Ocosingo, la investigación más reciente ha sido elaborada por Linares (2022), donde se realizó un análisis del queso Bola de Ocosingo del productor Laltic, a partir del uso de la técnica DGGE con distintos juegos de cebadores. Se determinó que con la región amplificada V4-V7 y V7-V8 del gen DNAr 16S se logró identificar como especie dominante a *Streptococcus spp.* Con la región V3 se identificó como dominantes a *Streptococcus spp.*, *Acinetobacter lwoffii*, *Escherichia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.* y *Klebsiella pneumoniae*.

Al amplificar un fragmento del gen *rpoB* se identificó como dominantes a *Lactococcus garvieae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*, mientras que los no dominantes fueron *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Escherichia coli*.

2. Justificación

En comparación a estudios y evaluaciones realizadas en algunos quesos madurados elaborados con leche cruda, para el queso Bola de Ocosingo no se han realizado suficientes análisis detallados de la microbiota bacteriana presente.

Debido a que el queso Bola de Ocosingo no presenta ningún tratamiento térmico en su elaboración, es de nuestro interés evaluar y comparar mediante métodos independientes de cultivo, la composición de las comunidades bacterianas presentes, así como determinar algunas características fisicoquímicas, como la actividad acuosa (a_w), pH y acidez, de los quesos de Bola elaborados por distintos productores de la región de Ocosingo.

3. Hipótesis

Dado que el Queso Bola Ocosingo se elabora de forma artesanal por los queseros de la región, a partir de leche cruda y que en su proceso de elaboración no se involucra ningún tratamiento térmico, se observarán diferencias en la composición de la microbiota bacteriana; se espera el desarrollo dominante de bacterias ácido lácticas en los quesos.

4. Objetivos

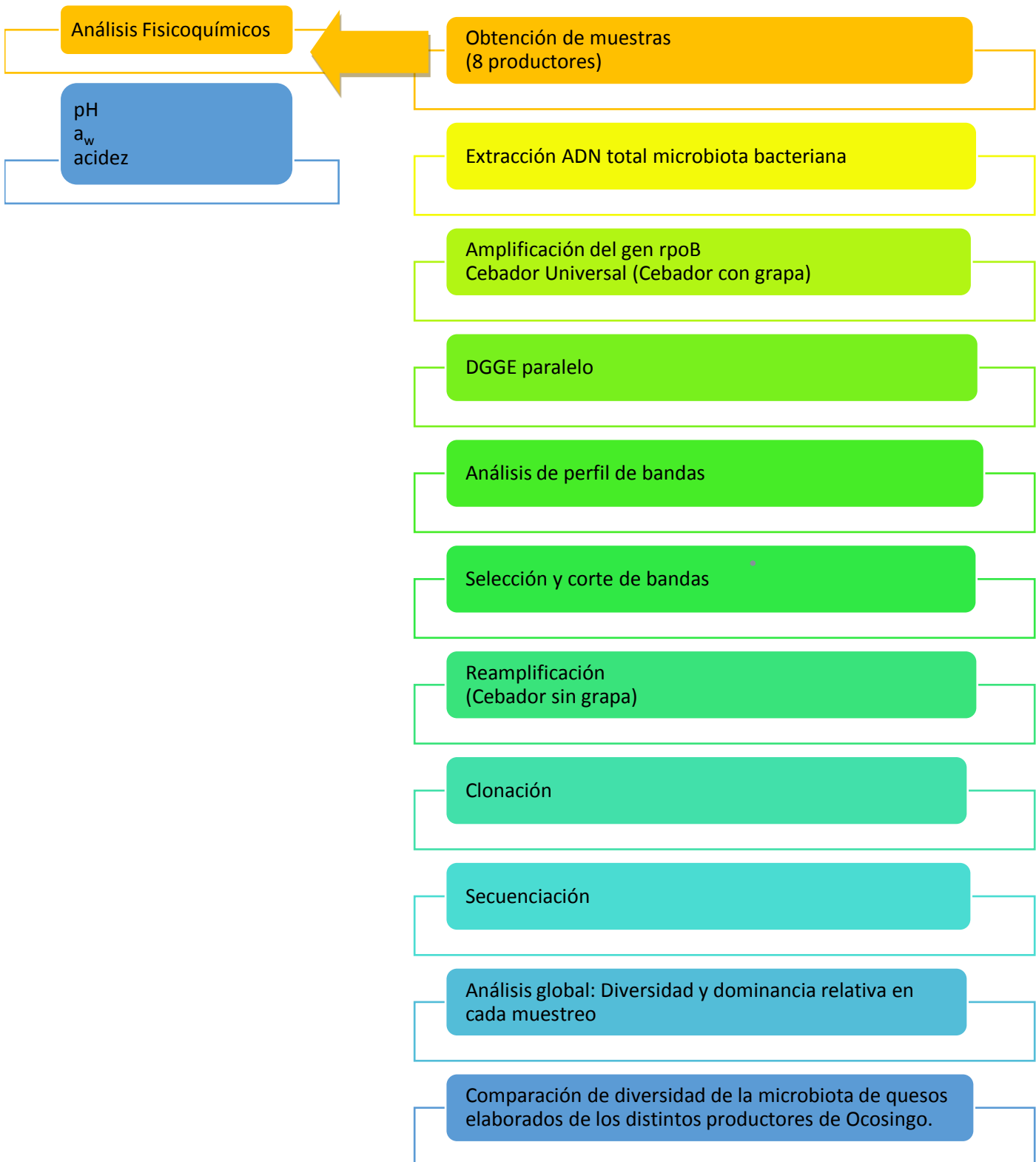
4.1 General

- Comparar la diversidad de la microbiota bacteriana presente en el queso Bola de Ocosingo elaborado por distintos productores de la región de Ocosingo, Chiapas.

4.2 Particulares

- Determinar las características fisicoquímicas de los quesos Bola de Ocosingo de ocho productores: acidez, pH y actividad acuosa (a_w).
- Comparar la comunidad bacteriana presente en los quesos elaborados por los distintos productores a través de la técnica DGGE mediante análisis de la secuencia parcial del gen *rpoB*.
- Determinar y comparar diversidad y dominancia relativa de las comunidades bacterianas presentes en los distintos quesos.

5. Estrategia experimental



6. Materiales y métodos

6.1 Obtención de la muestra

Para el estudio se analizaron dos piezas de queso Bola de Ocosingo colectadas de 8 queserías con puntos de venta ubicados en el municipio de Ocosingo, Chiapas, México. Durante los días 29 agosto al 09 septiembre del 2019 (Latitud Norte:16°54' 46.4" Longitud Oeste:92°4' 14.8). Una vez colectados y durante su traslado a la Ciudad de México fueron almacenados en refrigeración. En el laboratorio se congelaron las muestras a -20°C. Para su procesamiento se tomaron las muestras a analizar y se descongelaron transfiriéndolas en refrigeración a 4°C durante 24 h. Posteriormente, fueron manipulados en campana de flujo laminar y con material esterilizado para cada muestra con el fin de evitar contaminación cruzada.

6.2 Análisis fisicoquímico.

En la evaluación fisicoquímica se realizó el análisis de cada una de las dos piezas colectadas por triplicado

❖ pH (NMX-F-317-S-1978) y acidez (NMX-F-206-1986)

Se pesaron 9 g de queso en balanza analítica (Ohaus) y fueron colocados en un matraz de 250 mL con 100 mL de agua destilada, pH 7, a temperatura ambiente. Se incubaron a 30 °C / 200 rpm /15 min. Se filtró cada muestra por gravedad. Se midió el pH con potenciómetro (Hanna HI 4211). Se tomaron 25 mL de filtrado con 0.5 mL de fenolftaleína 1%. Se titularon con NaOH 0.1 N hasta la obtención de vire rosa claro persistente.

❖ a_w (Manual LabSwift- a_w . Neutec Group Inc. Novasina)

Se colocó aproximadamente 1 g de muestra distribuida homogéneamente en la base que incluye el equipo (LabSwift- a_w marca Neutec Group Inc. Novasina). Se colocó la tapa de plástico con muestra dentro del equipo y se comenzó la lectura automática.

6.3 Análisis de la microbiota

6.31 Recuperación de paquete celular

Se pesaron en campana de flujo laminar 15 g de muestra dentro de una bolsa para Stomacher (Servard). Se adicionaron a cada muestra 50 mL de citrato de sodio al 2 % (p / v), pH 8, posteriormente se homogenizaron durante 2 min / 3000 rpm dentro del Stomacher, para llevar a cabo una ruptura mecánica de la matriz del queso. Se adicionaron 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. Se mezclaron dentro del Stomacher durante 2 min a alta velocidad. Posteriormente, se incubaron durante 1 h / 1000 rpm / 45 °C. Seguido se dividió la muestra en dos tubos estériles de 50 mL, donde se centrifugaron a 3500 rpm / 7 min / 4 °C para lograr separar las fracciones de proteína y grasa de las células de los microorganismos. Se transfirió la fase intermedia, la cual contiene las células de los microorganismos, a un tubo de 50 mL. Se centrifugaron a 8000 rpm / 5 min / 4 °C, se desecharon los sobrenadantes y se lavaron los paquetes celulares tres veces con solución salina al 0.85 %, pH 7, se centrifugaron en cada ocasión en las condiciones anteriormente mencionadas. Posteriormente, se resuspendieron los paquetes celulares en 1 mL de solución salina 0.85% (p / v) y se transfirieron a un tubo de 2 mL (Anexo A). Finalmente, se centrifugaron a 14000 rpm / 10 min / 4 °C y se eliminaron el sobrenadante. Los paquetes celulares se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

6.32 Extracción de ADN de microorganismos del Queso Bola

Una vez recuperado el paquete celular se siguieron las indicaciones del protocolo de extracción de ADN del Mericon Food kit (QIAGEN), donde la ruptura celular se realiza con enzimas y detergentes iónicos, la purificación del ADN se basa en su unión específica a una membrana de sílica. Se premezclaron en un tubo de 2 mL, 2.5 µL de proteinasa K, 1 mL de solución de lisis y 10 µL de lisozima. Se adicionaron la mezcla al pellet y se agitaron en vórtex, se incubaron a 65 °C / 600 rpm / 30 min. Posteriormente se dividió la muestra en 2 tubos de eppendorf de 2 mL a los que se les añadieron 500 µL de cloroformo, se agitaron y centrifugaron a 12000 rpm / 20 min / 4 °C. Con ayuda de una micropipeta se transfirieron la fase superior a un tubo

ependorf de 2 mL, donde se añadieron 500 μ L de buffer de unión. Se procedió a transferirlo a una columna spinQIAquick montada en un tubo de 2 mL y se centrifugaron a 500 rpm / 5 min / 4 °C, se lavaron la columna con 500 μ L de buffer de lavado y se centrifugaron a 10000 rpm / 1 min / 4 °C. Se adicionaron 50 μ L de buffer de elución previamente calentado a 65 °C / 10 min. Finalmente se centrifugaron a 10000rpm/ 2 min/ 4°C, desechando la columna y conservando el ADN a -20 °C hasta su uso (Anexo B). Para el análisis del ADN extraído se cuantificaron la concentración de ADN obtenido para cada muestra, midiendo la absorbancia ($A_{260/280}$) como índice de pureza. Se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) teñido con bromuro de etidio 0.1 % (Genomic DNA Extraction Kit Manual).

6.33 Amplificación del gen *rpoB*

El ADN se sometió a una reacción de amplificación de un fragmento de aproximadamente 350 pb del gen *rpoB* (*rpoB*1698f AACATCGGTTTGATCAAC. *rpoB*2041r CGTTGCATGTTGGTACCCAT). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p / v) teñido con bromuro de etidio 0.1% (v / v) para visualizar los productos de amplificación, se utilizaron el marcador de peso molecular DNA Ladder 1kb y se obtuvo la concentración midiendo la absorbancia (A_{260} / A_{280}) en el espectro Epoch (Biotek). En la Tabla 3, se presentan las concentraciones y volúmenes requeridos de cada reactivo para la PCR.

Tabla 3. Reactivos para PCR para gen *rpoB*

	Reactivo	C_i	C_f	Vol. p/1 reacción(50 μ L)
1	Agua	---	---	35.6
2	10X Buffer	10X	1X	5
3	Cebador F	10 μ M	0.3 μ M	1.5
4	Cebador R	10 μ M	0.3 μ M	1.5
5	dNTPs	10 mM	0.2 mM	1
6	Enzima Accupol	2.5 U/ μ L	0.24 U/ μ L	0.4
7	ADN	20 ng / μ L	100 ng	5
Volumen total				50 μL

La amplificación se analizó en el termociclador (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones de PCR para los fragmentos del gen *rpoB* (Tabla 4)

Tabla 4. Condiciones óptimas para PCR para gen *rpoB*

No. De ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	5 min
20	95	1 min
	58	1 min
	72	1 min
10	95	1 min
	55	1 min
	72	1 min
1	72	7 min

6.34 Amplificación de la región V3 del DNAr 16S

El ADN se sometió a una reacción de amplificación de un fragmento de aproximadamente 180 pb de la región V3 del gen DNAr 16S usando los cebadores 338F ACTCCTACGGGAGGCAGCAG - B518R ATTACCGCGGCTGCTGG). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p / v) teñido con bromuro de etidio 0.1% (v / v) para visualizar los productos de amplificación, se utilizaron el marcador de peso molecular DNA Ladder 1kb y se obtuvo la concentración midiendo la absorbancia (A_{260} / A_{280}) en el espectro Epoch (Biotek). En la tabla 5, se presentan las concentraciones y volúmenes requeridos de cada reactivo para la PCR.

Los amplicones de ambos genes que se utilizaron para el DGGE se obtuvieron con unos cebadores Directos a los que se añadieron una secuencia rica en guanina y citosina, denominada grapa, de 40 bases al extremo 5': (CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCCCCGCCCC).

Las amplificaciones se realizaron en el termociclador (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones de PCR para los fragmentos de la región V3 del DNAr 16S (Tabla 6).

Tabla 5. Reactivos para PCR para la región V3 del DNAr 16S

	Reactivo	C_i	C_f	Vol. p/1 reacción (50 µL)
1	Agua	---	---	35.6
2	10X Buffer	10X	1X	5
3	Cebador F	10 µM	0.3 µM	1.5
4	Cebador R	10 µM	0.3 µM	1.5
5	dNTPs	10 mM	0.2 mM	1
6	Enzima Accupol	2.5 U/ µL	0.24 U/ µL	0.4
7	ADN	20 ng / µL	100 ng	5
Volumen total				50 µL

Tabla 6. Condiciones óptimas para PCR de para la región V3 del DNAr 16S

No. De ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	5 min
20	95	1 min
	65	30 s
	72	1 min
10	94	1 min
	55	30 s
	72	1 min
1	72	5 min

6.35 DGGE paralelo

Para el análisis de las muestras mediante DGGE se utilizó el equipo Dcode™ Universal Mutation System apparatus de BIORAD. Siguiendo el procedimiento descrito primeramente por Muyzer & colaboradores (1993), para geles de 16 x 16 cm, se cargaron 4 µg del amplicón de cada una de las muestras y se agregaron buffer de carga 2X (en una relación de volumen 1:2 ADN / buffer), individualmente en los pozos del gel de poliacrilamida al 8% con el gradiente desnaturizante óptimo (Anexo C). La electroforesis se corrió bajo las siguientes condiciones: 80 V durante 17 h a 60 °C, en buffer TAE 1X. Posteriormente los geles fueron teñidos en plata y se tomaron fotografías con el equipo *ChemiDoc XRS System* (Bio-Rad) y fueron analizados con el programa ImageLab 6.0.1 de Bio-Rad (Anexo D). Después de la digitalización se procedió a cortar las bandas del gel y almacenarlas.

6.36 Análisis del perfil de bandas en DGGE paralelo

Los perfiles de digitalización del gel DGGE, permiten detectar las bandas presentes en todos los carriles de las muestras, sin embargo, se observaron bandas suficientemente tenues que no fue posible detectar fácilmente por el software, mismas que fue necesario agregar manualmente. El software ImageLab 6.0.1 a partir del perfil de bandas obtenido nos permitió calcular algunos parámetros como dominancia relativa, riqueza específica, índice de similitud y análisis de agrupamiento UPGMA.

Dominancia relativa: La intensidad de las bandas en un análisis de DGGE de los amplicones analizados, está relacionada con la proporción de ADN de un organismo en la muestra, es decir, la dominancia relativa de cada individuo presente en la muestra (Muyzer, et al., 1995; Van Hannen, et al., 1999). La dominancia relativa (DR) es el resultado de la suma de la intensidad relativa promedio (IRp) de cada banda 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 ($IRp \leq DR$).

Riqueza específica: se conforma por el número de especies presentes en la comunidad o muestra, corresponde al número de bandas por carril.

Índice de similitud: El índice de similitud de Sørensen-Dice (S_D) nos permite realizar una comparación de las comunidades con caracteres similares. El índice comprende valores que van de 0 a 1, siendo 1 el valor que expresa completa similitud y a valores inferiores cuando hay menor similitud entre muestras. Este valor es calculado a partir de una matriz de ausencia/presencia de bandas obtenidas a partir de un DGGE. Su ecuación es la siguiente:

$$SD = \frac{2\text{Tot}N_{AB}}{N_A + N_B}$$

Donde:

Tot N_{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

UPGMA: Con los datos de presencia o ausencia tomados de un perfil de DGGE, se pueden realizar análisis de agrupamiento usando el índice de similitud de Jaccard o Dice. Este método asume que las especies son grupos por sí mismas, luego relaciona los dos grupos más cercanos basado en la matriz de distancias, recalcula la matriz de distancia y repite el proceso hasta que todas las especies estén conectadas a un único grupo. El método UPGMA realiza todos sus cálculos con la matriz calculada hallando la distancia genética entre las OTUs.

6.37 Tratamiento de las bandas escindidas del gel

Para recuperar el amplicón contenido en cada banda del gel, se siguió el procedimiento experimental de Gafan & Spratt, (2005), donde se indica cortar individualmente con un bisturí estéril las bandas de interés, posteriormente cada banda se coloca en un microtubo de 2 mL limpio y se agregan 50 μ L de agua desionizada filtrada estéril, pH 8, se incuba a 37 °C por 1 hora y se almacena a 4 °C por 24 h. Posteriormente el amplicón recuperado se concentra hasta obtener una concentración aproximada de 10 ng / μ L y se reamplifica utilizando los cebadores del gen *rpoB* (sin grapa), siguiendo las condiciones y mezcla de reacción, descritas en las tablas 3 y 5. Finalmente, los amplicones reamplificados fueron purificados utilizando el kit DNA Clean & concentrator de ZYMO RESEARCH siguiendo las instrucciones del proveedor y concentrados de manera que al cargar 2 μ L en un gel de agarosa pudieron ser visualizados como bandas intensas.

6.38 Clonación

Con el propósito de obtener secuencias limpias de cada una de las muestras, previo a la secuenciación se realizaron las clonaciones del fragmento amplificado. De esta manera se obtuvieron buenas secuencias para la identificación. Se utilizó el kit cloneJET PCR cloning, INVITROGEN, el cual es un sistema avanzado de selección positiva para la clonación de productos de PCR de alta eficiencia, puede clonar con alta eficiencia fragmentos de ADN romos o adhesivos.

Se realizaron las clonaciones del fragmento amplificado con los cebadores sin grapa con el uso del vector de clonación pJET1.2/blunt (Figura 4). Este vector contiene un gen letal que se altera, mediante la ligadura de un inserto de ADN en el sitio de clonación. Como resultado, solo las células con plásmido recombinantes pueden propagarse, eliminando la necesidad de un cribado azul/blanco. EL vector acepta inserciones de 6 pb a 10 kb. Los extremos 5' del vector contienen grupos fosforilo, por lo que se requiere la fosforilación de cebadores de PCR. El vector contiene un gen *bla* (Amp^R) de resistencia a la ampicilina, también posee el promotor lacUV5 y

T7 para la expresión del gen insertado en la región de clonado múltiple y contiene el gen letal *eco47IR*, que permiten la selección de las bacterias que han sido correctamente transformadas con el vector ligado. La relación óptima de inserto: vector es de 3:1 (Tabla 7).

Tabla 7. Reactivos de kit CloneJET PCR Cloning

Reactivo	Volumen para una reacción
Buffer de reacción 2X	10 μ L
Producto de PCR no purificado ó	
Producto purificado *	1 μ L
pJET 1.2/blunt (50 ng/ μL)	1 μ L
Agua libre de nucleasas	7 μ L
T4 DNA ligasa	1 μ L
Volumen total	20 μ L

Durante la ligación, las reacciones se dejaron incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, para la transformación se transfirieron 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 agitaron ligeramente y se inocularon en medio LB con antibiótico (ampicilina). Las cajas se incubaron a 37° C por 12 h, se seleccionaron dos colonias por muestra, las cuales se inocularon en 5 mL de medio LB líquido más antibiótico y se incubaron a 37° C y 250 rpm por 16 horas. Posteriormente se hizo la extracción de plásmido con el kit GeneJET Plasmid Miniprep de Thermo Fisher, siguiendo las instrucciones del proveedor.

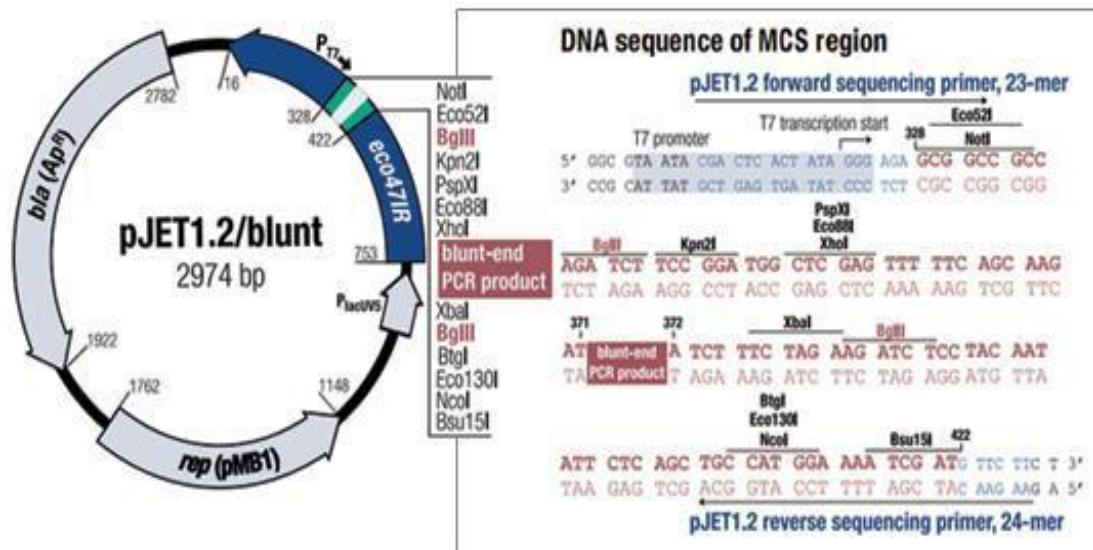


Figura 4. Vector clonación pJet1.2/blunt.

Una vez realizada la extracción del plásmido se realizó un paso de digestión en el cual el vector se linealizó utilizando la enzima XhoI para corroborar la presencia del inserto y descartar la presencia de ADN genómico de *E. coli* (condiciones mostradas en el Anexo E).

6.39 Purificación y amplificación del inserto a clonar

Los plásmidos recuperados se reamplificaron con el par de cebadores sin grapa correspondiente, se emplearon los cebadores del gen *rpoB*. Posteriormente se realizaron escisión del gel de agarosa de las bandas de interés de los amplicones y fueron purificados con el uso del kit QIAEXII gel extraction, QIAGEN, siguiendo las instrucciones del manual, para posteriormente ser secuenciadas. Las muestras purificadas se enviaron para su secuenciación a MACROGEN, Seúl, Corea.

6.40 Secuenciación y análisis

Las muestras elegidas fueron posteriormente secuenciadas por MACROGEN-Corea empleando el gen *rpoB*. Para cada muestra se obtuvo una secuencia consenso comparando la secuencia obtenida con el cebador Directo y el cebador Inverso utilizando el programa DNADynamo. Las secuencias resultantes se compararon con las reportadas en la base de datos National Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nih.gov/>), utilizando los servicios del MegaBLAST para buscar los parientes más cercanos, y de esta manera clasificarlas dentro de un género mediante un alineamiento con el uso de la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, análisis realizado en septiembre del 2021) seleccionando la identificación con el mayor porcentaje de cobertura e identidad.

6.41 Análisis inferencia filogenética

El análisis de relación filogenética se realizó para las muestras obtenidas de la secuenciación de la amplificación parcial del gen *rpoB* utilizado, a su vez se clasificaron en bacterias Gram positivas y Gram negativas para su agrupamiento. La relación filogenética fue inferida con el uso del software MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 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 análisis involucró tanto a las secuencias problema como secuencias de referencia tomadas del NCBI. El valor que 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).

7. Resultados y Discusión

7.1 Descripción histórica y proceso de elaboración del Queso Bola de Ocosingo

El Queso Bola de Ocosingo presenta ciertas características que le dan un sabor distintivo, lo que lo posiciona como un queso original entre los distintos quesos artesanales mexicanos, principalmente por su proceso de elaboración artesanal relacionado con condiciones agroecológicas específicas. Con datos del H. Ayuntamiento Municipal de Ocosingo, se encontró el registro de por lo menos 18 queserías que elaboran el queso Bola en Chiapas. Actualmente, existen 8 productores del Queso Bola activos, que para esta investigación fueron contactados para los análisis. Con la finalidad de ampliar la difusión de la producción del queso Bola y brindar soporte a las queserías en su desarrollo y comercialización, en el año 2004 fue creada la Sociedad Agropecuaria e Industrial Quesera de Ocosingo S.P.R de R.I (SAIQUO) por el municipio de Ocosingo, misma que actualmente no está en función.

En el año 2005, el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) otorgó a la Sociedad del Queso Bola de Ocosingo la Marca Colectiva (MC). En las Reglas de Uso se describe el proceso de elaboración del queso Bola de Ocosingo, además se manifiesta que la leche utilizada para la elaboración del queso debe ser ordeñada en la región. Por otra parte, se mencionan las características básicas para la elaboración de este: peso, forma, tiempo de maduración y aditivos añadidos. Sin embargo, actualmente la MC no está vigente desde el año 2014. Esto sugiere un inconveniente para el fortalecimiento de la organización, considerando que no se tiene claridad en el objetivo de la marca colectiva y, por ende, dificulta y vulnera la originalidad y producción del Queso Bola de Ocosingo.

La producción del Queso Bola es de escala pequeña, algunos productores lo elaboran sólo en ciertas temporadas, principalmente en verano cuando la producción de leche es mayor y algunos otros lo elaboran durante todo el año. Los quesos varían un poco en presentación sabor entre los productores de la región. La

cantidad aproximada de leche requerida para la elaboración de los quesos en promedio es de 120 L, sin embargo, requieren de 500 a 700 L diarios para satisfacer la demanda de venta en la localidad, así como para la distribución en San Cristóbal de las Casas, Tuxtla Gutiérrez y Mérida.

En cuanto al proceso de elaboración del queso entre los distintos productores es variado, lo que se considera como una ventaja comercial ya que los quesos de cada productor suelen tener un sabor distintivo. Son elaborados con técnicas no estandarizadas, pero siguen los mismos procesos para su elaboración, todos se producen con leche cruda, sin adición de leche en polvo u otros sustitutos. De acuerdo con los testimonios de los mismos productores recabados en esta investigación, algunas queserías del municipio tienen ranchos donde ordeñan y producen el queso, mientras que otros compran la leche en ranchos aledaños. Las razas del ganado para la ordeña suelen ser diferentes, principalmente proviene de vacas criollas mezcladas con cebú y pardo suizo, las cuales son sometidas a una adecuada alimentación y cuidado, además de que cada animal lleva un registro de vacunación.

Es importante destacar que los productores elaboran sus quesos con procesos no estandarizados, es decir, no utilizan la misma materia prima y la cantidad añadida de las distintas materias primas empleadas es variable, los tiempos de reposo y cuajado son diferentes en las etapas de elaboración, así como el tiempo de maduración. Si bien en las Reglas de Uso se establece que se debe dejar madurar al menos 21 días, algunos productores utilizan un tiempo de maduración que van desde los 10 días hasta los 90 días, como originalmente se realizaba hace décadas.

En cuanto a las queserías, la mayoría de ellas se encuentran ubicadas en el centro del municipio de Ocosingo, dentro o cerca de la ciudad de Ocosingo. Estas generalmente son pequeños cuartos que son adaptados para que sea posible la elaboración del queso. Están equipados con barras forradas con azulejo usadas como base para la elaboración del producto, cuentan con una sección donde se

maduran los quesos y una zona para colgar y desuerar. El suero obtenido es recolectado y los productores les dan otro uso, por ejemplo, como es una solución rica en proteínas sirve de alimento de engorda para el ganado y algunos otros lo utilizan para la elaboración de algunos productos como requesón y refrescos. El cuarto se encuentra cerrado durante la elaboración del queso y las ventanas tienen una malla para evitar el acceso de insectos u otros animales pequeños, todo el proceso es realizado a temperatura ambiente. Cuando se elabora el queso, el artesano suele vestir con un mandil como protección, botas industriales, cofia, no utilizan guantes, ni cubrebocas. La jornada laboral comienza regularmente a las 6 am con la recolección de la lecha u ordeña de vacas y por día, generalmente, se logran elaborar 2 lotes de 15 quesos cada uno.

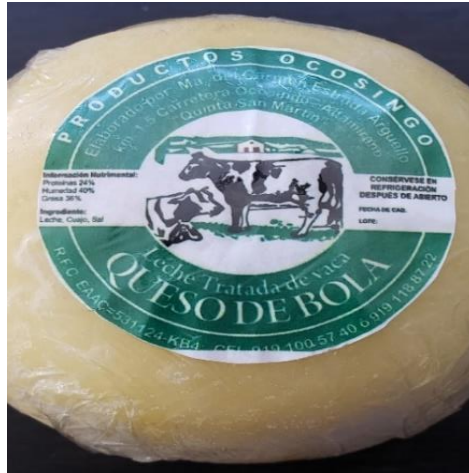
De las queserías seleccionadas para esta investigación, las de mayor tiempo de antigüedad son Laltic, Queshill y Santa Rosa con más de 60 años de experiencia, seguida de La Peña, La Regional y Quesería Ocosingo de aproximadamente 40 años y las más recientes La Maya y Dorados de la Selva con aproximadamente 10 años de antigüedad.

7.2 Colección de muestras y observaciones

Se colectaron muestras de quesos Bola de Ocosingo de 8 productores en la región de Ocosingo. Una vez iniciado el procesamiento de los quesos para sus respectivos análisis, se procedió a realizar una lista de observaciones de cada producto. Se compararon datos de peso, precio y características de empaquetado. Se observó que, en cuanto a las características anteriormente mencionadas, los quesos de Bola son variables entre los diferentes productores por lo que se evidencia a simple vista que no hay una homogeneidad en la elaboración del producto.

Quesería Ocosingo

Presenta dos forros de queso rígido y en capas delgadas. El queso de la pasta es bastante suave, comparado con los demás productores. Para su venta el producto es forrado con plástico adherible. Se observó la presencia de una capa blanquecina alrededor del queso. Se venden en Bola chica y grande con un peso que va de 376-800 g. El precio oscila entre \$60 -\$130.



Quesería Laltic

Presenta dos forros rígidos con capas muy delgadas. El queso de la pasta está compactado y es de consistencia semirrígida y endurecido. Se vende en Bola chica y Bola grande, con un peso que va de 355 – 820 g. El precio oscila entre \$60 - \$120.



Quesería La Maya

Presenta un forro sin rigidez y sólo una capa. El queso de la pasta es suave. Para su venta el producto es empaquetado al vacío, además con una capa de plástico adherible. Sólo está a la venta un tamaño de Bola que oscila entre 489 -509 g. El precio es de \$105



Quesería La Peña

Presenta forro rígido con dos capas gruesas. El queso de la pasta es suave y compactado. Sólo está a la venta un tamaño de Bola que oscila entre 422 – 750 g. El precio es de \$100



Quesería La Regional

Presenta dos forros, son menos rígidos comparados con los demás productores, además el forro interno es delgado. El queso de la pasta es suave. Sólo está a la venta un tamaño de Bola que oscila entre 469 -534 g. El precio es de \$130



Quesería Dorados de la Selva

Presenta un forro bastante rígido con dos capas delgadas. El queso de la pasta es bastante suave. Se observó un ablandamiento en la base del queso. Sólo está a la venta un tamaño de Bola que oscila entre 281 -284 g. El precio es de \$75.



Quesería Queshill

Presento un forro rígido con dos capas gruesas. El queso de la pasta es bastante suave. Sólo está a la venta un tamaño de Bola que oscila entre 370 -373 g. El precio es de \$60



Quesería Santa Rosa

Presenta un forro suave, con una capa externa delgada y una capa interna bastante gruesa. El queso de la pasta esta compactado y ligeramente endurecido. Sólo está a la venta un tamaño de Bola que oscila entre 369 -371 g. El precio es de \$60



7.3 Evaluación de parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos a_w , acidez y pH se evaluaron en dos unidades de muestreo: queso 1 y queso 2, por triplicado para la pasta y el forro, se muestran los promedios de cada determinación (Anexo H). Con los valores obtenidos para cada parámetro fisicoquímico, se realizó un análisis estadístico para determinar si había diferencias significativas entre las muestras, para esto se utilizó el método estadístico de Fisher.

7.31 Actividad Acuosa (a_w)

El valor de a_w en productos fermentados es uno de los principales factores determinantes para el crecimiento y actividad metabólica de los microorganismos. El término de a_w indica el agua disponible para el crecimiento de microorganismos y para que se puedan llevar a cabo diferentes reacciones químicas y bioquímicas. Algunos de los factores que afectan la actividad acuosa son, por ejemplo, la relación humedad total y cantidad de solutos, contenido en NaCl, cenizas y el pH (Choi, *et al.*, 2016). Los valores de a_w de la pasta de los quesos se muestran en la Tabla 8 y Figura 5.

Entre los diferentes quesos madurados mexicanos donde se han determinado sus características fisicoquímicas, han presentado valores de a_w en un rango de 0.89 a 0.953, datos similares al rango registrado para la pasta del queso Bola de Ocosingo. Tal es el caso del queso Cotija con una maduración de al menos 3 meses, el cual presenta un a_w de 0.89, los quesos adobera de Jalisco y queso Chihuahua menonita con un a_w de más de 0.950. En esta investigación se observó que la mayoría de las muestras tuvieron un a_w cercano a 0.940, misma que se ha observado en algunos quesos madurados mexicanos como es el añejo de Zacazonapan y el queso Poro de Tabasco (Tabla 9).

Tabla 8. Valores de a_w de la pasta y forro de queso Bola de diferentes productores.

PRODUCTOR	PASTA		FORRO	
	QUESO 1	QUESO 2	QUESO 1	QUESO 2
Ocosingo	* 0.943 ^E	0.938 ± 1.5 E ^{-03 C}	* 0.907 ± 1.4 E ^{-03 B}	0.912 ± 1.4 E ^{-03 D}
Laltic	0.937 ± 5 E ^{-04 D}	0.935 ± 1.1 E ^{-03 C}	* 0.901 ± 1.4 E ^{-03 A}	0.891 ± 7 E ^{-04 B}
La Maya	0.952 ± 5 E ^{-04 G}	0.950 ± 1 E ^{-03 D}	0.952 ^D	0.950 ± 7 E ^{-04 E}
La Peña	0.896 ± 3 E ^{-03 A}	0.897 ± 5 E ^{-04 A}	* 0.907 ± 1.4 E ^{-03 B}	0.848 ± 2.8 E ^{-03 A}
La Regional	* 0.945 ± 5 E ^{-04 E}	0.932 ± 3.5 E ^{-03 B}	* 0.914 ± 7 E ^{-04 C}	0.907 ± 1.4 E ^{-03 C}
Dorados de la Selva	* 0.947 ± 1 E ^{-03 E}	0.936 ± 3.6 E ^{-03 C}	* 0.915 ± 2.1 E ^{-03 C}	0.904 ± 3.5 E ^{-03 C}
Queshill	* 0.908 ± 9 E ^{-03 B}	0.896 ± 5 E ^{-04 A}	* 0.905 ± 1.4 E ^{-03 B}	0.849 ± 3.5 E ^{-03 A}
Santa Rosa	* 0.922 ± 5 E ^{-04 C}	0.930 ± 5 E ^{-04 B}	0.907 ± 1.4 E ^{-03 B}	0.908 ± 7 E ^{-04 D}

Diferentes letras muestran una diferencia estadística con un $\alpha= 0.05$ comparando cada uno de los productores en los valores obtenidos para la pasta y el forro; Con (*) los productores que presentaban diferencias estadísticas con un $\alpha =0.05$ en el análisis de queso 1 y 2.

En general, para ambos quesos de los diferentes productores, se observó que las muestras con menor a_w corresponden para Queshill y La Peña y los productos con a_w mayor para La Maya y Dorados de la Selva. En relación con el queso 1 y queso 2 para los diferentes productores se observaron 6 y 4 grupos estadísticamente significativos, respectivamente. En cuanto a la relación de queso 1 y queso 2 de un mismo productor también se pudieron observar diferencias significativas.

El contenido de sal en una muestra no es el único determinante relacionado con el valor de a_w . En alimentos fermentados, en particular los quesos madurados, el a_w está definido en función de otros solutos y compuestos como el ácido láctico,

algunos aminoácidos, péptidos y calcio que contribuyen en las variaciones del valor de la actividad acuosa (Dimitrellou, *et al.*, 2019). Como ya se ha mencionado anteriormente, de acuerdo con las reglas de uso el queso Bola de Ocosingo requiere una maduración de al menos 21 días. Sin embargo, este parámetro no está estandarizado, se observó que cada quesería mantiene un tiempo diferente de maduración y un uso de diferentes proporciones de crema y sal en su elaboración, lo que podría explicar las variaciones en el a_w entre los diferentes productores e incluso entre los quesos de un mismo productor.

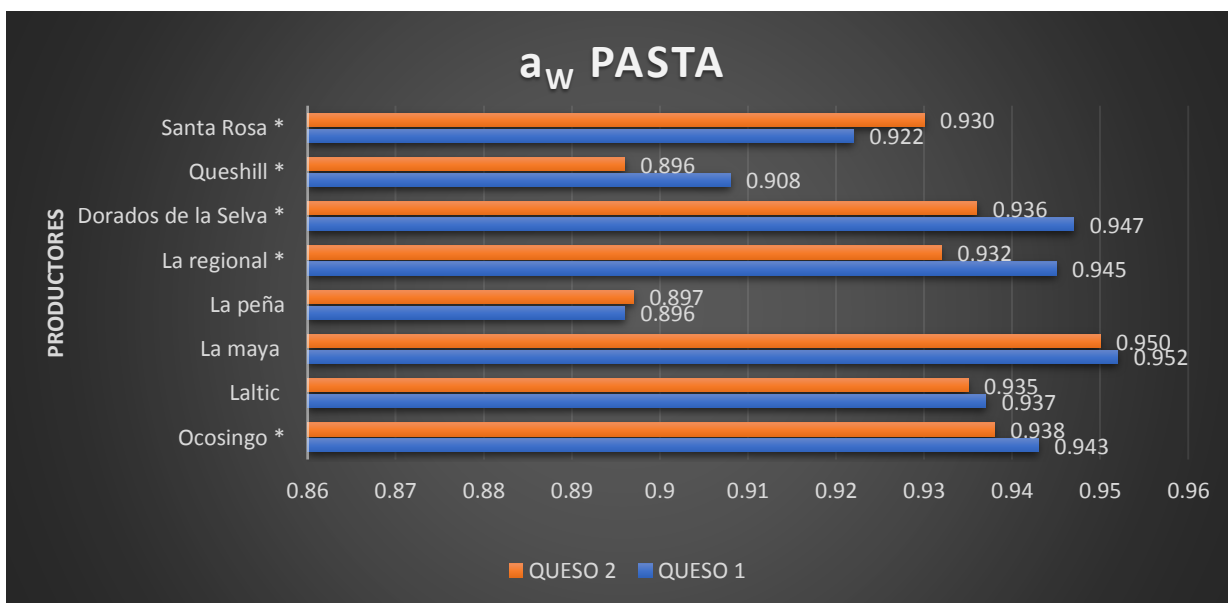


Figura 5. Valores de a_w de la pasta de los quesos de diferentes productores. Con (*) los productores que presentaban diferencias estadísticas con un $\alpha = 0.05$ en el análisis de queso 1 y 2.

Tabla 9. Algunas características fisicoquímicos de quesos madurados mexicanos.

Producto	Descripción	a_w	pH	Referencia
Bola de Ocosingo	madurado de 21 días elaborado con leche cruda	0.909 ±5.77E-04	5.16 ± 0.03	Camacho, 2019
Bola Ocosingo	madurado de 21 días elaborado con leche cruda	0.938 ±0.03	4.50 ± 0.02	López, <i>et al.</i> , 2014
Cotija región de origen	madurado al menos 3 meses elaborado con leche cruda	0.890 - 0.91	5.40 -5.80	Chombo-Morales, <i>et al.</i> , 2016
Poro de Tabasco	2 semanas de maduración elaborado con leche cruda	0.940	4.34	Villanueva-Carvajal, <i>et al.</i> , 2018
Adobera de Jalisco	Semi-madurado	0.953	5.14	Ruvalcaba-Gómez, <i>et al.</i> , 2020
Añejo de Zacazonapan	más de 2 meses de maduración elaborado con leche cruda	0.940	5.20	Hernández-Morales, <i>et al.</i> , 2010
Chihuahua menonita	Maduración de más de 2 semanas	0.950	5.25	Gallegos, 2015

Los valores de a_w obtenidos de las muestras de forro de los quesos mostraron un rango de 0.901 a 0.952 para los quesos 1 (Laltic y La Maya, respectivamente) y de 0.848 a 0.950 (La Peña y La Maya, respectivamente) (Figura 6).

En general para ambos quesos de los diferentes productores se observó que las muestras con menor a_w en el forro corresponden para los quesos 2 de Queshill y La Peña y los productos con a_w mayor para La Maya, misma tendencia observada en el a_w de las muestras de pasta. En relación con el queso 1 y queso 2 para los diferentes productores se observaron 6 y 4 grupos estadísticamente significativos, respectivamente. En cuanto a la relación de queso 1 y queso 2 de un mismo productor también se pudieron observar diferencias significativas. Esto se atribuye a lo mencionado anteriormente, que en la elaboración del queso de Bola no están

bien definidas las proporciones de sal, cuajo y a las diferencias en los procesos de elaboración de los quesos entre los distintos productores.

Como se puede observar en ambas determinaciones, hubo un valor de a_w menor en el forro comparado con la pasta, en la mayoría de los quesos. Esto mismo se observó en la determinación de Camacho, 2019 para dos lotes de queso de Bola. Esto se puede atribuir a que en la elaboración del forro después de desuerar, queda una cuajada rica en caseína que, al orearse, adquiere una consistencia rígida por la pérdida de humedad y otros procesos, lo que se puede evidenciar con el a_w más bajo en la corteza. Sin embargo, esto no se observó en la muestra La Maya en el cual el valor a_w se mantuvo similar en la pasta y en el forro. En el queso La Maya, se observó que la corteza era de una consistencia bastante suave muy similar a la de la pasta, además de que presentaba un empaque al vacío, el cual no le permitió orearse y endurecerse con el tiempo, de esta manera se acumularía humedad en la superficie, por lo que se mantuvo la a_w igual al de la pasta.

La a_w de los alimentos frescos y procesados es uno de los factores que determina su carácter perecedero o estable, así como la microbiota que es capaz de desarrollarse en los mismos. Igualmente, influye en los tipos de microorganismos patógenos que pueden desarrollarse. Los microorganismos patógenos crecen fácilmente a un a_w de >0.98 , aunque otros agentes pueden influir en su proliferación. A un valor de a_w de 0.93 a 0.97, se inhibe el crecimiento de algunas bacterias Gram negativas patógenas y proliferan las bacterias Gram positivas (Bacillaceae, Lactobacillaceae, Micrococaceae). En alimentos con a_w de 0.85 a 0.93, crecen principalmente bacterias Gram positivas, mohos y levaduras, *S. aureus* puede proliferar, pero no produce enterotoxinas (Badui-Dergal, 2016). De acuerdo con esta información, los quesos Bola de Ocosingo analizados en esta investigación presentaron un rango general de a_w de 0.848 a 0.950, lo que sugiere que de acuerdo con este parámetro no presentaría microbiota bacteriana patógena, sin embargo, se

esperaría la proliferación de bacterias ácido lácticas que normalmente se encuentran en productos lácteos fermentados con el mismo rango de a_w .

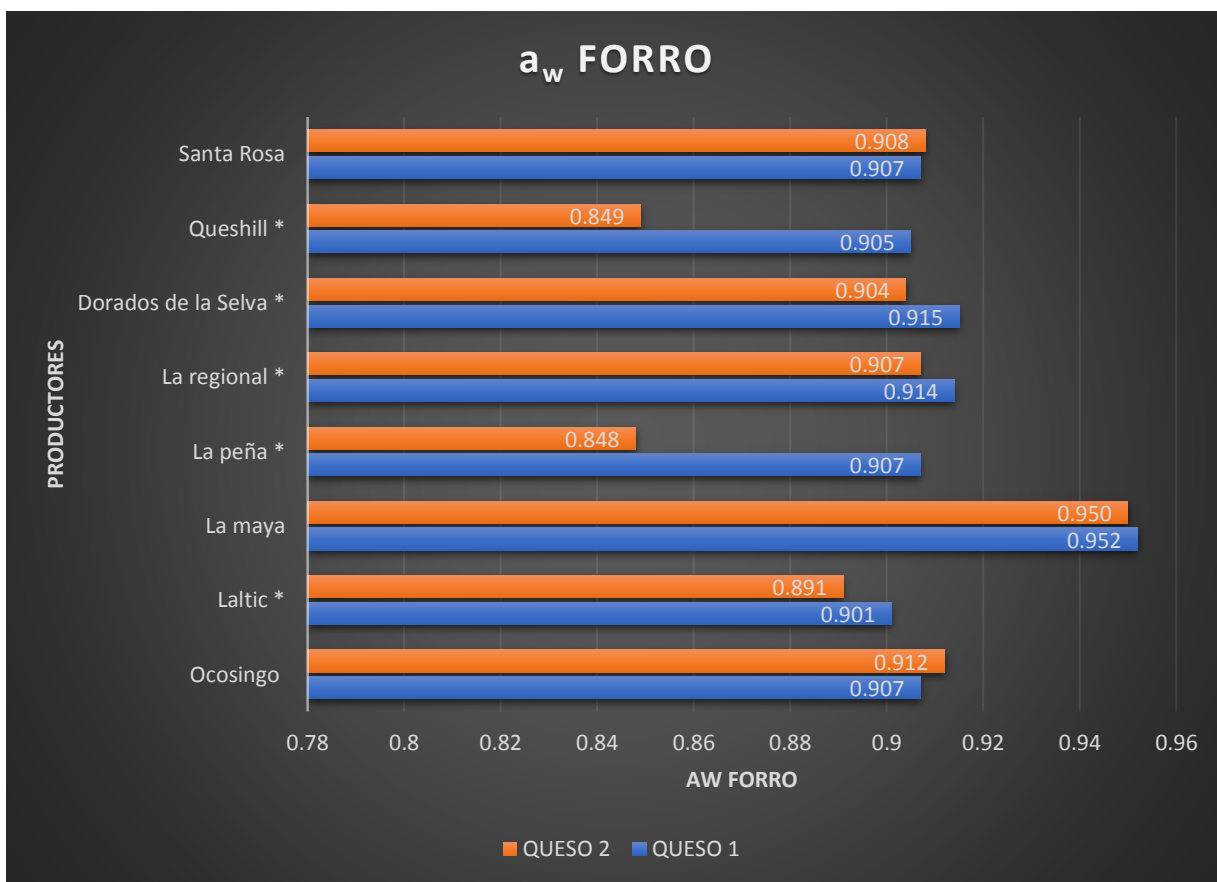


Figura 6. Valores de a_w del forro de los quesos de diferentes productores. Con (*) los productores que presentaban diferencias estadísticas con un $\alpha = 0.05$ en el análisis de queso 1 y 2.

7.32 Acidez y pH

Se determinaron los valores de acidez para los quesos de Bola de los diferentes productores de las muestras de pasta y el forro (Tabla 10 y Figuras 7 y 8).

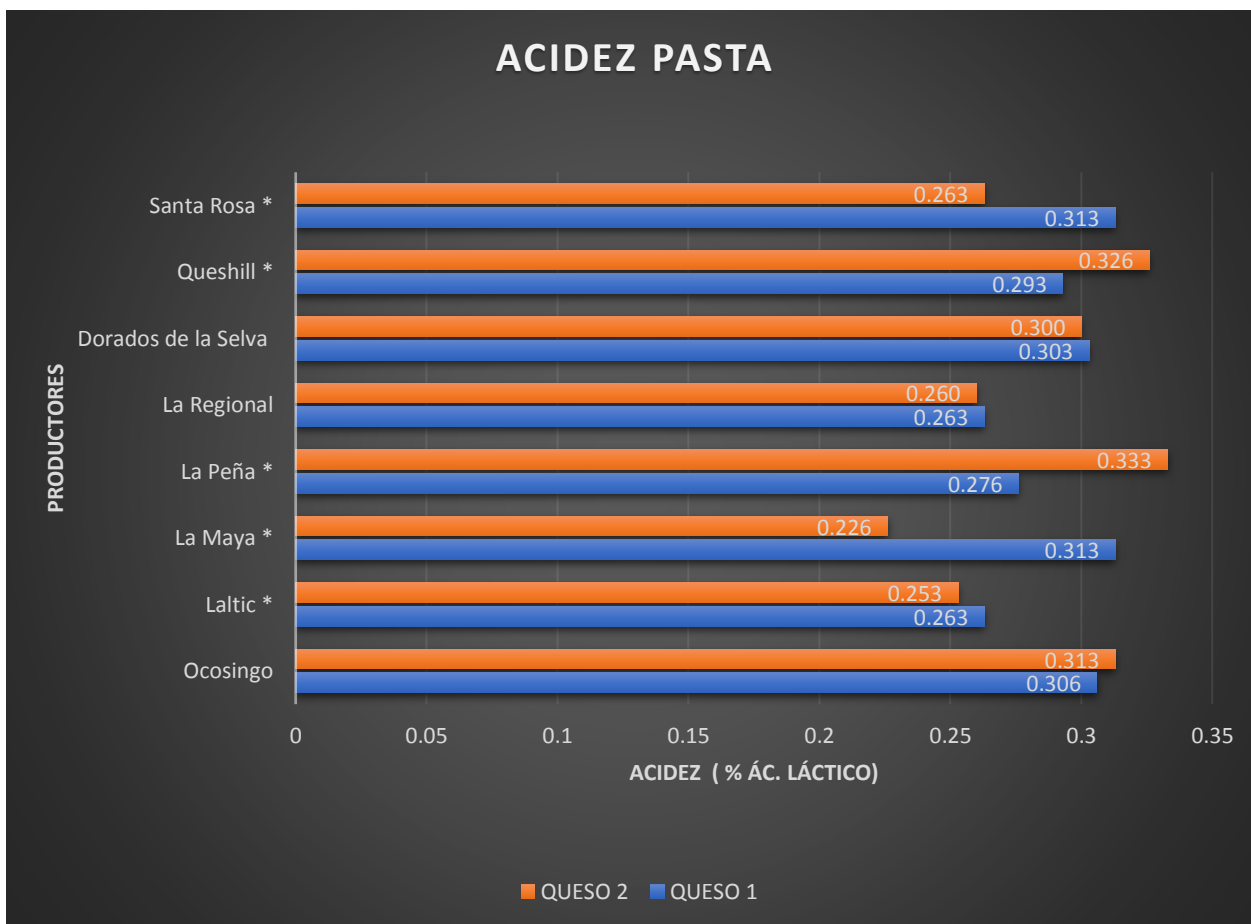


Figura 7. Valores de acidez de la pasta de los quesos de diferentes productores. Con (*) los productores que presentaban diferencias estadísticas con un $\alpha = 0.05$ en el análisis de queso 1 y 2.

La acidez mayor en el forro comparada con la pasta se ha observado anteriormente en el análisis realizado por Camacho, 2019 para dos lotes de queso de Bola, en el cual se registró un valor de acidez menor en la pasta y mayor en el forro. Esto se atribuye a que, durante la elaboración del forro, la leche es descremada posteriormente cuajada y puesta a un proceso de acidificación para que sea posible adquirir la consistencia hilada necesaria para fungir como cubierta.

Tabla 10. Valores de acidez y pH de la pasta y forro de queso Bola Ocosingo de diferente productor.

	ACIDEZ PASTA		ACIDEZ FORRO		pH PASTA		pH FORRO	
	QUESO 1	QUESO 2	QUESO 1	QUESO 2	QUESO 1	QUESO 2	QUESO 1	QUESO 2
Ocosingo	0.306 ±0.05 ^D	0.313 ±0.05 ^D	* 0.462 ±0.057 ^c	0.582 ±0.057 ^d	3.98 ±0.01 ^D	4.10 ± 0.08 ^D	*5.07 ± 0.02	5.50 ± 7 E ^{-03 D}
Laltic	*0.263 ±0.05 ^A	0.253 ±0.05 ^B	0.462 ±0.057 ^C	0.462 ±0.057 ^c	*3.71 ± 5 E ^{-03 A}	3.65 ± 0.01 ^C	5.00 ± 0.03 ^A	5.04 ± 5.7 E ^{-03 B}
La Maya	*0.313 ±0.05 ^E	0.226 ±0.05 ^A	*0.420 ^B	0.448 ^C	*5.25 ± 0.01 ^E	4.96 ± 5 E ^{-03 F}	*5.70 ± 0.05 ^D	5.51 ± 0.01 ^D
La Peña	*0.276 ±0.05 ^B	0.333 ±0.05 ^F	*0.414 ±0.057 ^A	0.428 ±0.057 ^A	3.77 ± 0.01 ^A	3.80 ± 5 E ^{-03 B}	*5.18 ± 0.01 ^C	5.12 ± 0.02 ^C
La Regional	0.263 ±0.05 ^A	0.260 ^C	*0.418 ±0.057 ^A	0.438 ±0.057 ^B	3.90 ± 5 E ^{-03 B}	3.90 ± 0.01 ^A	*5.00 ± 0.01 ^A	5.07 ± 0.01 ^B
Dorados de la Selva	0.303 ^D	0.300 ±0.05 ^D	*0.462 ±0.057 ^c	0.594 ± 5.4 E ^{-16 D}	*3.95 ± 0.01 ^D	4.05 ± 0.03 ^D	*5.09 ^B	5.51 ± 5.7 E ^{-03 D}
Queshill	*0.293 ±0.05 ^C	0.326 ±0.05 ^E	0.576 ± 5.4 E ^{-16 D}	0.570 ±0.057 ^D	*4.21 ± 0.01	4.36 ^E	5.07 ± 5.7 E ^{-03 B}	5.05 ± 7 E ^{-03 B}
Santa Rosa	*0.313 ±0.05 ^E	0.263 ±0.05 ^C	*0.422 ±0.057 ^B	0.432 ^B	*3.90 ± 0.01 ^B	3.80 ± 5 E ^{-03 B}	*5.07 ± 0.01 ^B	5.00 ± 0.01 ^A

Diferentes letras muestran una diferencia estadística con un $\alpha = 0.05$ comparando cada uno de los productores en los valores obtenidos para la pasta y el forro; Con (*) los productores que presentaban diferencias estadísticas con un $\alpha = 0.05$ en el análisis de queso 1 y 2.

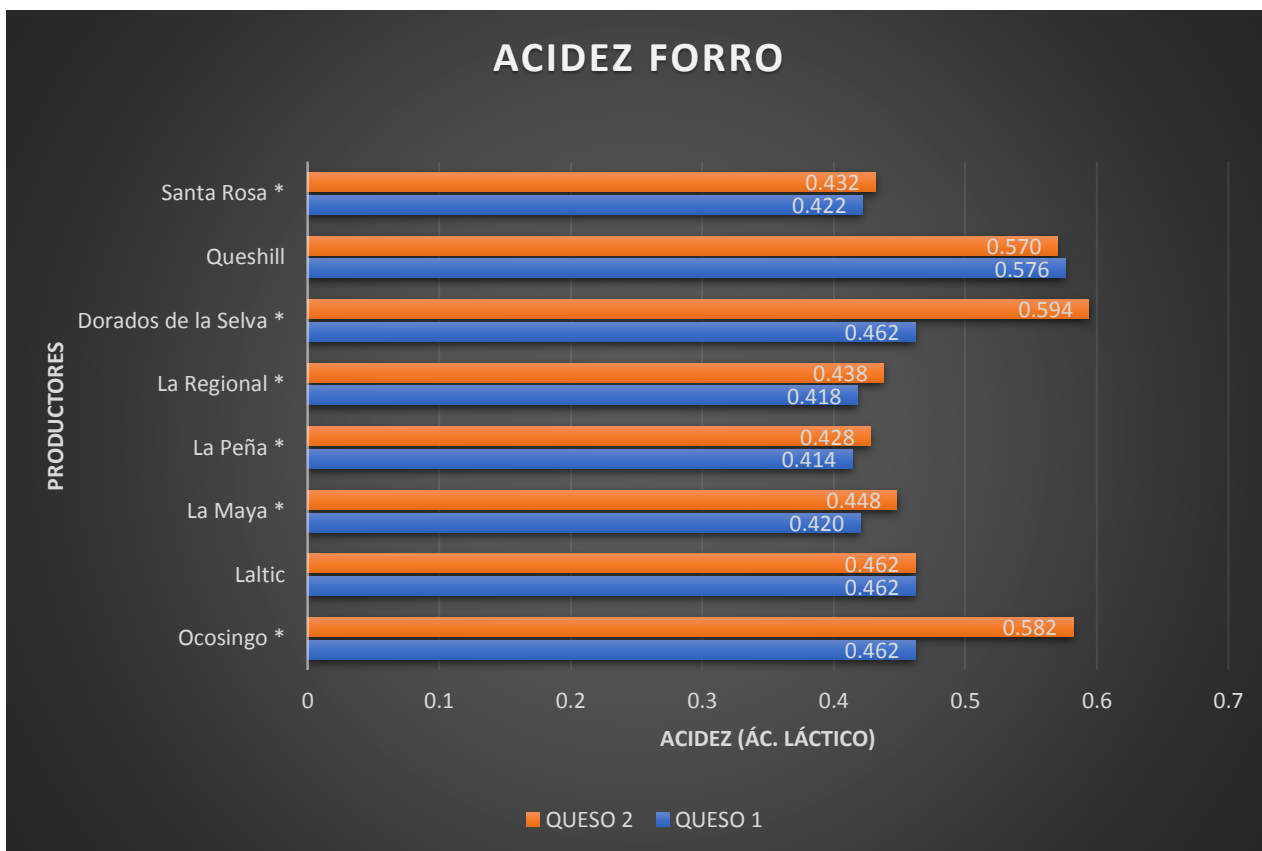


Figura 8. Valores de acidez del forro de los quesos de diferentes productores. Con (*) los productores que presentaban diferencias estadísticas con un $\alpha = 0.05$ en el análisis de queso 1 y 2.

De acuerdo con estos datos, existe una diferencia significativa entre los productores y entre lotes de quesos.

En cuanto a la determinación de pH de los quesos Bola de diferentes productores, los valores de la pasta y el forro se muestran en la Tabla 10 y Figuras 9 y 10. En cuanto a las características fisicoquímicas registradas en distintos quesos madurados mexicanos, se ha reportado un rango de pH para la pasta de 4.34 a 5.8 (Tabla 9). El valor de pH registrado para la pasta del queso Bola de Ocosingo de algunos productores se encuentra por debajo del valor comparado con otros quesos madurados mexicanos. La mayor acidez de la pasta podría estar relacionada con la presencia de bacterias ácido lácticas altamente acidificantes en el queso Bola de Ocosingo, como lo son algunas especies de *Streptococcus* y *Lactobacillus*.

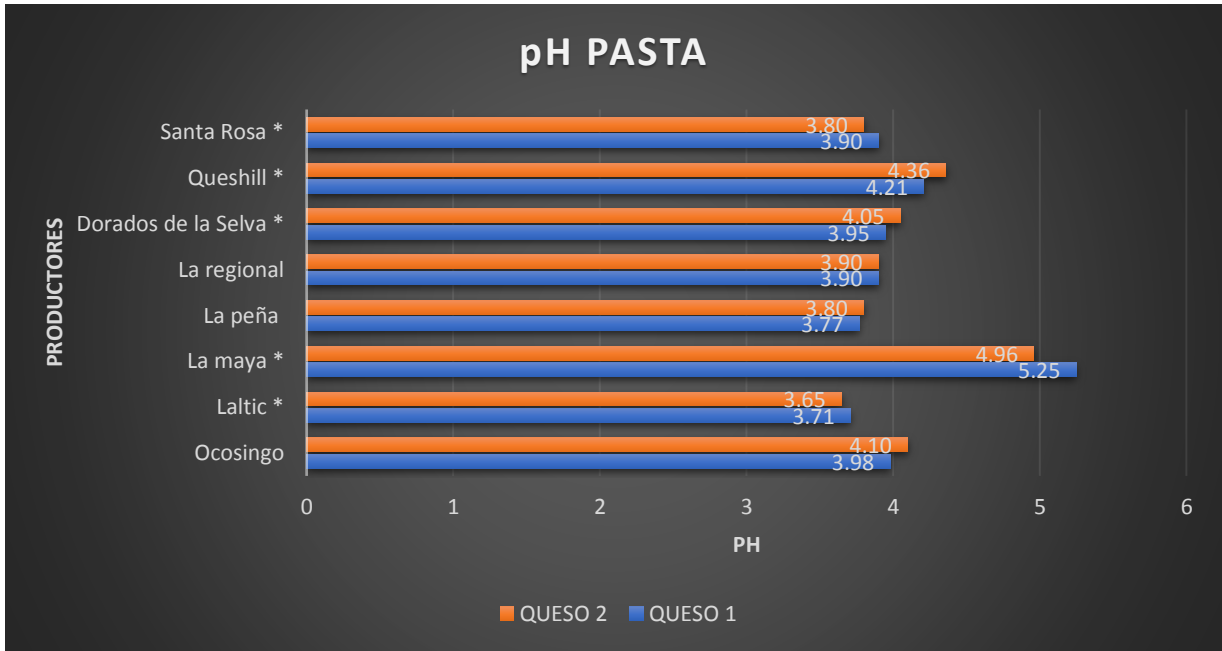


Figura 9. Valores de pH de la pasta de los quesos de diferentes productores. Con (*) los productores que presentaban diferencias estadísticas con un $\alpha = 0.05$ en el análisis de queso 1 y 2.

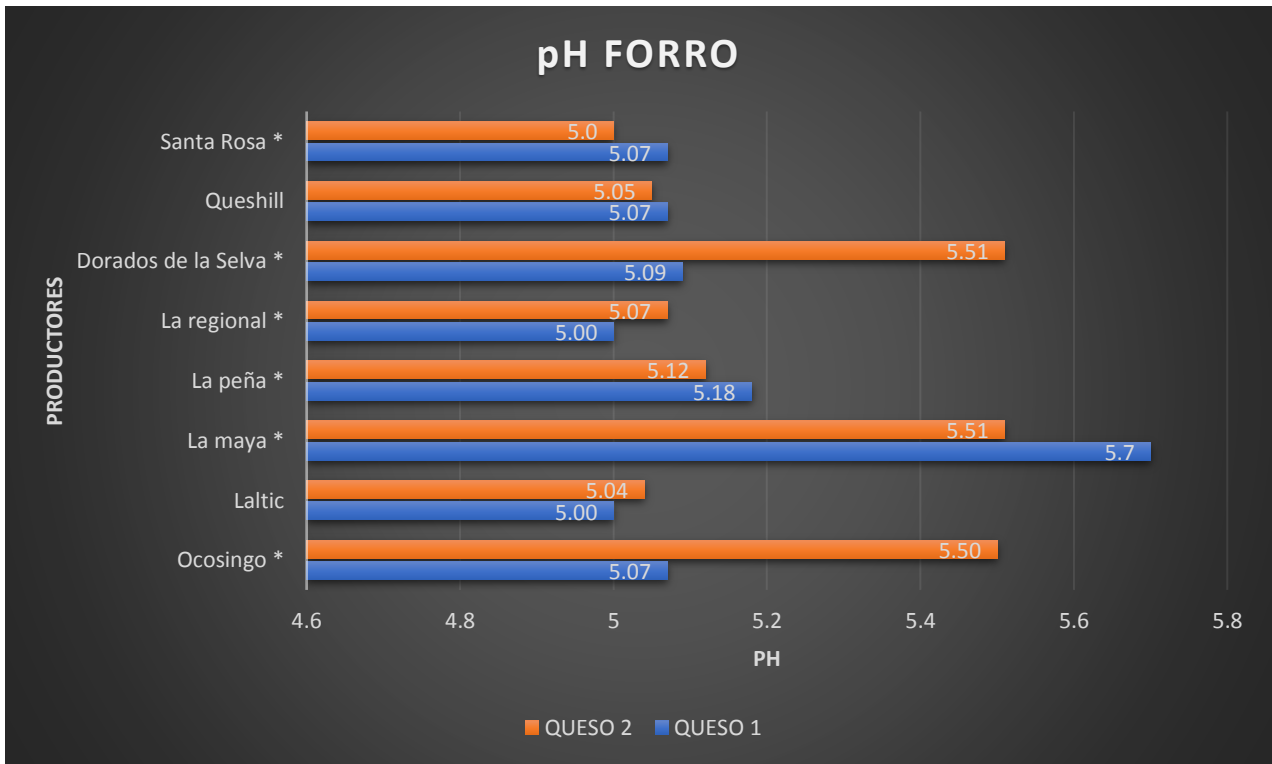


Figura 10. Valores de pH del forro de los quesos de diferentes productores. Con (*) los productores que presentaban diferencias estadísticas con un $\alpha = 0.05$ en el análisis de queso 1 y 2.

Las interacciones entre los distintos microorganismos en las muestras de quesos madurados reflejan su adaptación o contribución al desarrollo de los cambios fisicoquímicos en la matriz del queso, ya que se registró reducción de pH, deshidratación y reducción de a_w . Es posible considerar que los coliformes, que se pudieran encontrar en la leche cruda utilizada para la producción del queso Bola de Ocosingo, no tuvieron las condiciones para crecer durante la maduración. La reducción de enterobacterias, incluyendo *Escherichia coli* durante la etapa de maduración, ha sido reportada en otros quesos de leche cruda debido a las LAB que producen ácido láctico, CO_2 y péptidos que inhiben o matan estas bacterias (Piras et al., 2013, Chombo-Morales, 2008).

En general para ambos quesos de los diferentes productores, se observó que las muestras con menor pH corresponden para Laltic y Regional y los productos con pH mayor para La Maya. Se puede observar en la determinación de Camacho, 2019 para dos lotes de queso de Bola, corresponde a un valor de pH menor en la pasta y mayor en el forro, valores similares a los observados en los análisis para este estudio. De acuerdo con estos datos, existe una diferencia significativa entre los productores y entre lotes de quesos.

En la corteza del queso, al poseer una mayor superficie de exposición que el centro, sufre importantes cambios químicos y enzimáticos. Actividades enzimáticas, como una proteólisis, daría como resultado la formación de grupos amino libres, que al ser de naturaleza básica incrementan el pH de la corteza. El aumento de acidez en la corteza es debido a que su elaboración parte de leche descremada. Otro factor que afecta la acidez es el crecimiento microbiano, ya que durante la maduración los microorganismos que se encuentran en el queso son capaces de fermentar la lactosa del medio generando ácido láctico (Leclercq-Perlat, *et al.*, 2019). La fase de maduración de un queso es donde las bacterias ácido lácticas forman ácido láctico por medio de la fermentación de lactosa. Así pues, a un mayor tiempo de maduración, originará una mayor producción de ácido láctico, lo que originaría un descenso de pH. No obstante, no se observó una relación inversamente proporcional entre el comportamiento de la acidez y pH. Esto también se ha

observado en otros quesos madurados, como es el caso del Queso Cotija. Esto se podría explicar por la liberación de otros metabolitos, como ácidos orgánicos y aminoácidos, además de que la microbiota presente en el alimento usen el ácido láctico disponible como una fuente de carbono, disminuyendo su concentración (Bravo-Mendoza, 2008). Para comparar a los quesos de los diferentes productores, a través de los parámetros fisicoquímicos, se realizó la construcción de un dendrograma UPGMA, el cual se basa en una jerarquización de agrupamiento de muestras con distancias menores. Los valores analizados fueron los promedios de los fisicoquímicos de a_w , pH y acidez, de los quesos para los ocho productores, mismos que fueron utilizados para los siguientes análisis de la microbiota bacteriana (Figura 11).

En el dendrograma se pueden observar 3 diferentes grupos, en los cuales los quesos Dorados de la Selva y Ocosingo presentan una mayor similitud seguido de Santa Rosa y Queshill, en otro grupo se encuentran Laltic y La Peña como los más parecidos, junto con La Regional y el último grupo únicamente se encuentra La Maya. Estos análisis confirman que en cuanto a los parámetros fisicoquímicos existe una diferenciación entre los distintos productores, principalmente el productor La Maya, el cual, en todos los parámetros fisicoquímicos analizados, mostró valores significativamente diferentes comparado con los demás productores.

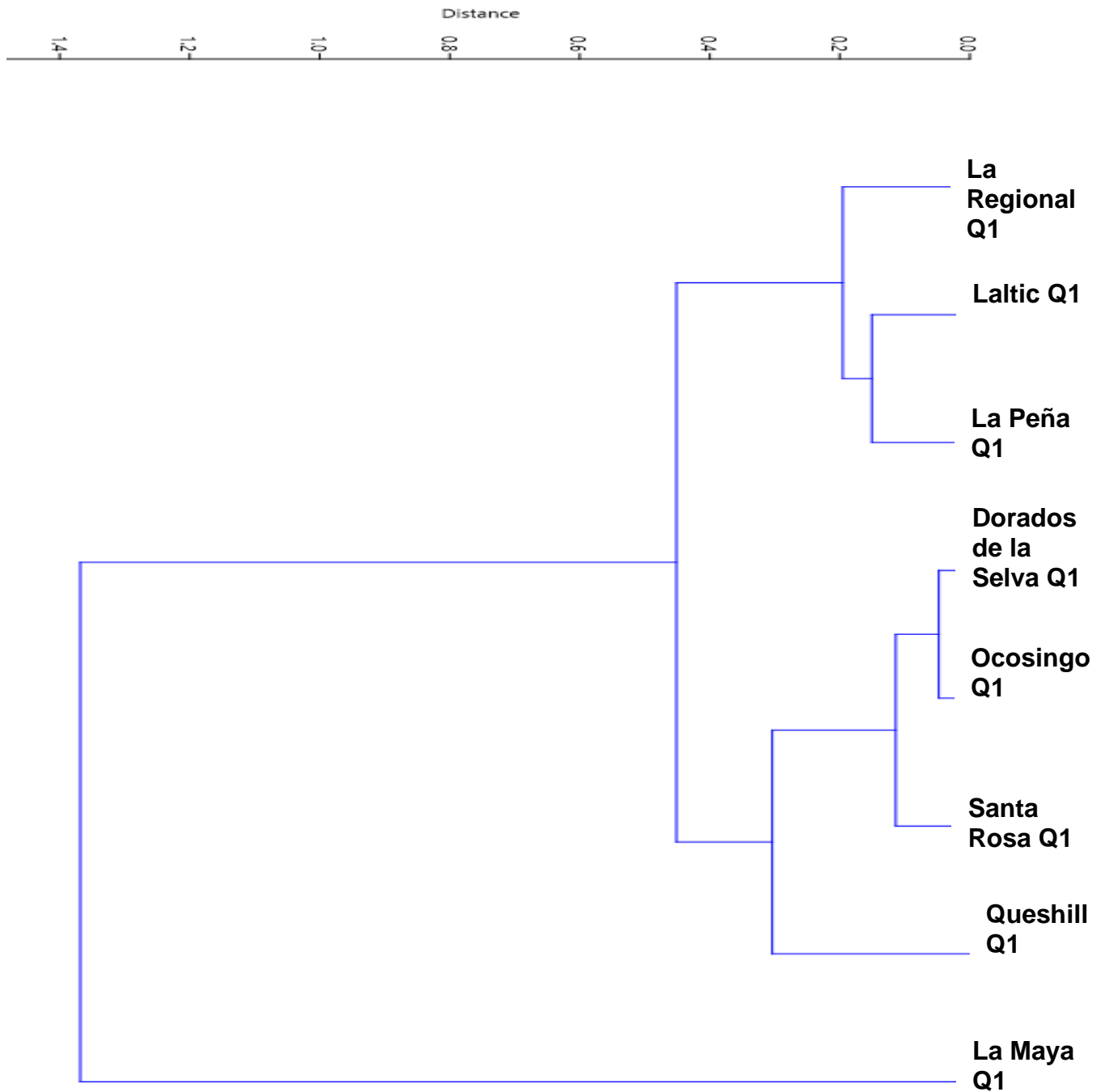


Figura 11. Análisis de agrupamiento UPGMA de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de Queso Bola de Ocosingo de diferentes productores

8. Análisis de la microbiota bacteriana

8.1 Extracción ADN de la microbiota bacteriana de quesos Bola de Ocosingo.

Es indispensable mencionar que el resto de la investigación se delimitó al estudio de un solo queso por productor debido a que la realización de los experimentos se vio interrumpida por las restricciones ocasionadas por la pandemia de COVID-19.

El ADN de los microorganismos se extrajo de la pasta de los quesos de Bola. Se muestran los valores de concentración de ADN (Tabla 11) de las extracciones realizadas, así como la relación A_{260}/A_{280} relacionada con la pureza del material genético extraído, con el uso del kit Mericon Food. Un valor entre 1.9 y 2 se considera ADN puro. Cuando se obtienen valores menores a 1.8 es probable que el ADN muestre cierta contaminación por presencia de proteína, mientras que, con valores superiores a 2 se sugiere contaminación por presencia de sales o RNA. Las muestras del ADN extraído se corrieron en un gel de agarosa para corroborar su integridad. Se muestran los gels de agarosa al 1 % (p/v) teñido con bromuro de etidio 0.1 % (Genomic DNA Extraction Kit Manual) de corrida de electroforesis, donde se visualiza los productos de la extracción de ADN de los quesos Bola de Ocosingo de diferentes productores. En la imagen se puede observar que los ADN de los microorganismos no se encuentran degradados y todos con valor de 1.90, lo que nos indica que es ADN puro (Figura 12 y Tabla 11).

Tabla 11. Valores de concentración de las muestras de ADN extraído de queso para todos los productores de queso de Bola obtenidas con uso de Mericon Food kit (QIAGEN).

Muestra	A_{260}/A_{280}	Concentración ng / μ L
1. Quesos Ocosingo	1.90	338.35
2. Laltic	1.90	495.30
3. La maya	1.90	239.40
4. La peña	1.90	283.90
5. La regional	1.90	350.00
6. Dorados de la Selva	1.90	383.40
7. Queshill	1.90	354.50
8. Santa Rosa	1.90	242.60

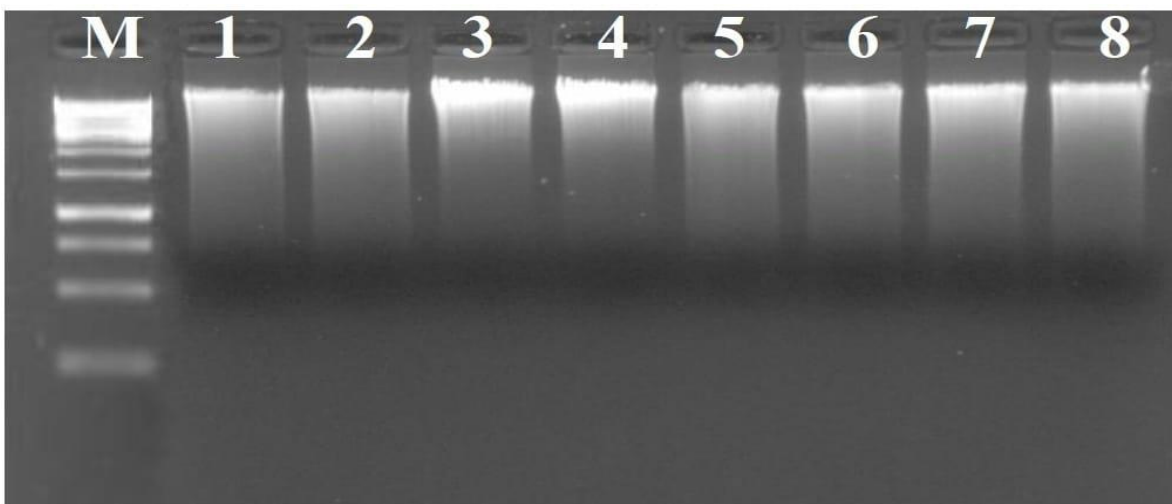


Figura 12. ADN total extraído de la microbiota bacteriana de queso Bola de Ocosingo extraídas con Mericon Food kit (QIAGEN). Gel de agarosa al 1.5%. Carga 5 μ L de cada muestra. Carril M: Marcador 1kb DNA Ladder; 1: OCOSINGO; 2: LALTIC; 3: LA MAYA; 4: LA PEÑA; 5: LA REGIONAL; 6: DORADOS DE LA SELVA; 7: QUESHILL; 8: SANTA ROSA

8.2 Amplificación de la región V3 del ADNr 16S y gen *rpoB*

Se realizó una amplificación de la región y del gen *rpoB* (cebador con grapa) con el ADN extraído en el paso anterior, para los 8 productores. Se presentan los valores de concentración (ng / μ L) obtenidos para cada amplicón, se observa además los valores de absorbancia cercanos a 1.90 para la región V3 del ADNr 16S y todos de 1.90 para *rpoB*, lo que nos indica que se tiene un ADN puro (Tabla 12).

Los amplicones obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 1.5 %. En la figura 13(a), se observa el producto de reacción del tamaño esperado, 343 pb, para la amplificación con el gen *rpoB*, para los quesos 1 de los 8 distintos productores. En la figura 13(b), se visualiza el producto de reacción del tamaño esperado, 180 pb, para la amplificación de la región V3 del DNAr 16S. Sin embargo, para los amplicones de la región V3 del ADNr 16S, se observó la presencia de dos bandas tenues en dos de las muestras, lo que sugiere posibles amplificaciones inespecíficas

o la formación de quimeras. Las quimeras son amplicones obtenidos a partir de secuencias de ADN independientes que, por una polimerización incompleta e hibridación durante las rondas de amplificación, generan una molécula híbrida que actúa como molde en los subsecuentes ciclos de amplificación (Petrosino *et al.*, 2009; Quince *et al.*, 2011), esto se observa cuando se forman bandas de un tamaño doble al amplicón esperado. En las otras amplificaciones y en todos los amplicones del gen *rpoB* se observa una única banda que corresponde al tamaño esperado, también se visualiza una banda en la parte inferior de todos los carriles con muestras, por el tamaño sabemos que son los cebadores.

Tabla 12. Valores de concentración de amplicones de PCR para la región V3 del ADNr 16S y *rpoB* para los quesos 1 de los diferentes productores.

Muestra	V3 del DNAr 16S		<i>rpoB</i>	
	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentración (ng / µL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentración (ng / µL)
Ocosingo	1.87	492.5	1.90	703.69
Laltic	1.85	1308.7	1.90	773.24
La maya	1.88	1200.7	1.90	775.31
La peña	1.88	522.4	1.90	768.35
La regional	1.87	506.5	1.90	660.34
Dorados de la Selva	1.87	509.8	1.90	661.51
Queshill	1.87	524.8	1.90	752.00
Santa Rosa	1.87	566.7	1.90	658.85

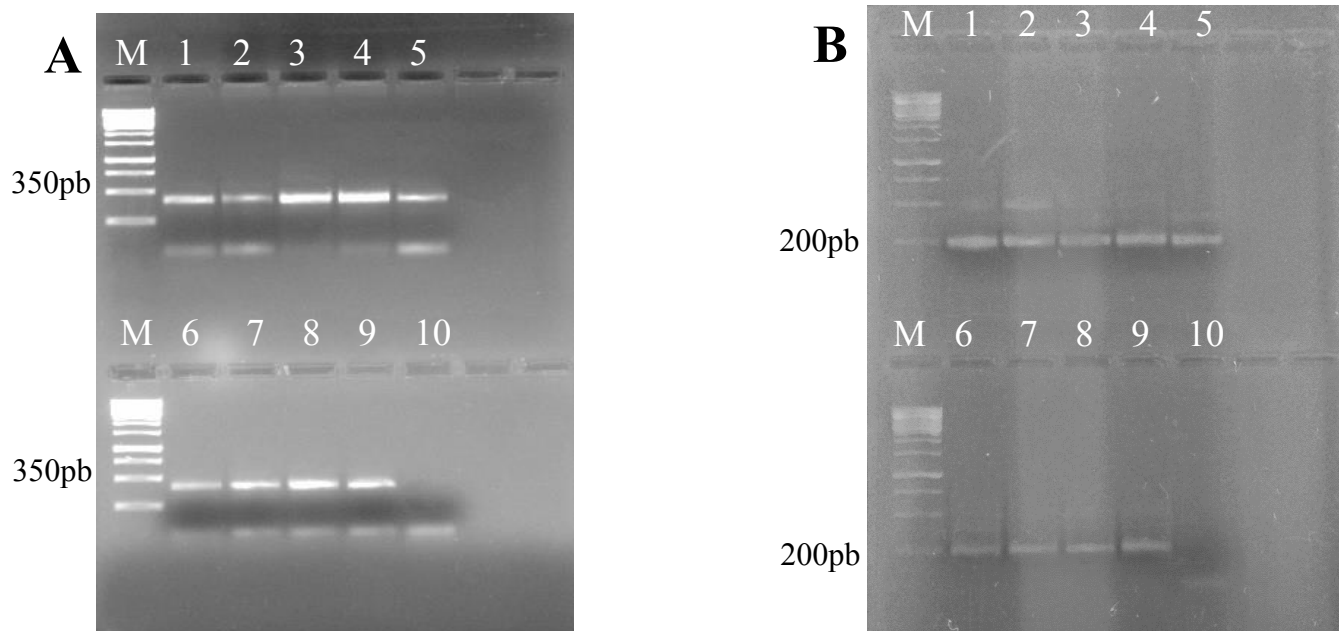


Figura 13. A) Amplicones de la región V3 del DNAr 16S. Gel de agarosa al 1.5%. 6µL por carril. B) Amplicones del gen *rpoB*. Gel de agarosa al 1.5%. 6µL por carril. Carril M: Marcador 1kb DNA Ladder; 1: Ocosingo; 2: Laltic; 3: La Maya; 4: La Peña; 5: La Regional; 6: Dorados de la Selva; 7: Queshill; 8: Santa Rosa, 9: *Lactiplantibacillus plantarum* 10: Blanco

8.3 DGGE y análisis digital de bandas: Región V3 del ADNr 16S y *rpoB*

Se realizó la corrida electroforética, en gel de poliacrilamida al 8 %, de los amplicones obtenidos en el paso anterior. Se utilizaron urea y formamida como agentes desnaturizantes y un gradiente de desnaturalización de 30 % a 60 % para los amplicones de la región V3 del DNAr 16S, previamente determinado por Casillas en 2013. En el caso del gen *rpoB* se utilizó el gradiente de desnaturalización de 40 % a 50 %, previamente determinado por Linares en 2022. En los geles se cargaron 3µg de amplicón para todas las muestras de queso.

El PCR-DGGE es una técnica ampliamente utilizada en algunos campos de la microbiología, como lo es en análisis de identificación y diversidad, dinámica y distribución espacial de comunidades microbianas, entre otras aplicaciones se ha usado en el análisis de la microbiota de algunos quesos artesanales (Ercolini, 2004). En contraste con los métodos de microbiología convencional, que imposibilitan la detección de microorganismos de baja proporción en ecosistemas complejos con poblaciones dominantes, el DGGE tiene un límite de detección de alrededor de 10^3

UFC/g (Randazzo, *et al.*, 2009). Una de las principales ventajas del uso de DGGE es que permite un análisis comparativo en una sola corrida, lo que se logró evidenciar en los perfiles de DGGE obtenidos de los amplicones de la región V3 del DNAr 16S y *rpoB* para las ocho muestras.

Una vez obtenido el gel de DGGE se realizó un análisis digitalizado para identificar y comparar el patrón de bandas de los amplicones obtenidos. La digitalización del patrón de bandas resulta una herramienta muy útil para un mejor manejo y eficiente análisis de datos (Tian, *et al.*, 2010). En la Figura 14, se muestra la representación digital (lado derecho) a partir del gel de DGGE obtenido (lado izquierdo) con el gen de la región V3 del DNAr 16S y en la Figura 15, se muestra el gel con gradiente desnaturante y su digitalización de los amplicones del gen *rpoB*. Se puede visualizar que, al comparar los patrones de bandas de ambos DGGE, hay diferencias en cuanto a los patrones obtenidos de la migración de las unidades taxonómicas operativas (OTUs) entre los diferentes productores.

En los análisis cualitativos para ambos genes estudiados, se observa que los patrones de bandas son diferentes entre las 8 muestras de los distintos productores. Sin embargo, también se puede apreciar que ciertos patrones se repiten entre las muestras, lo que sugiere que algunos microorganismos están presentes en todas o casi todas las muestras. También se puede observar que en el caso del DGGE de la región V3 del DNAr 16S, el gradiente desnaturante de 30-60% de urea y formamida no fue el óptimo para apreciar el patrón de bandas bien definido, además de que en el extremo superior se agruparon varias bandas que no se pudieron delimitar con el programa. Así mismo, se observó con el gel de DGGE para el gen *rpoB*, donde se aprecia una agrupación de bandas poco definidas en la parte central del gel. Motivo por el cual se recomienda optimizar los gradientes desnaturantes, para obtener una buena resolución de bandas.

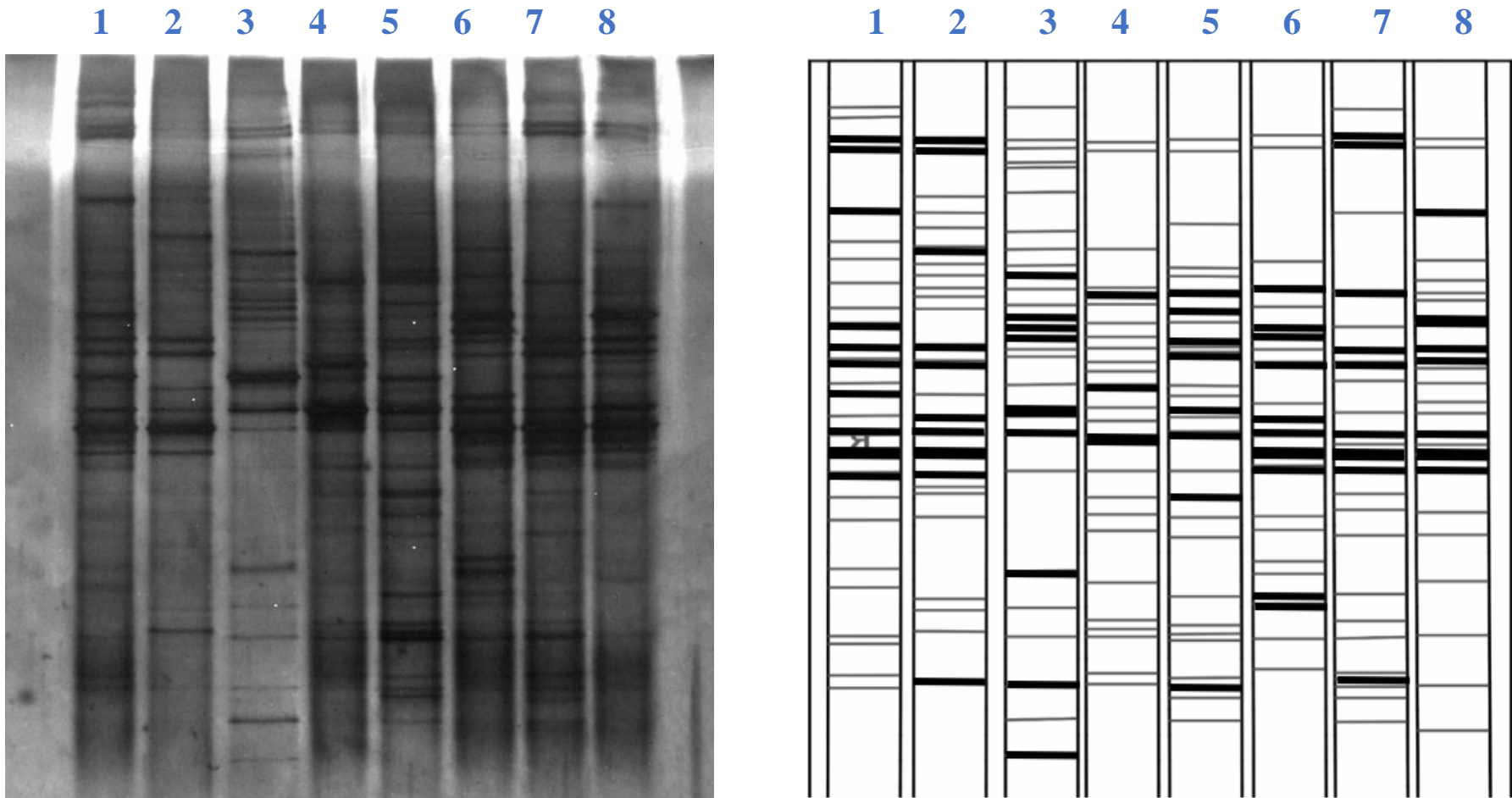


Figura 14. Patrón de bandas y perfil digital de DGGE de la region V3 del gen 16S de los quesos de Bola de los distintos productores.

1: Ocosingo; 2: Laltic; 3: La Maya; 4: La Peña; 5: La Regional; 6: Dorados de la Selva; 7: Queshill; 8: Santa Rosa

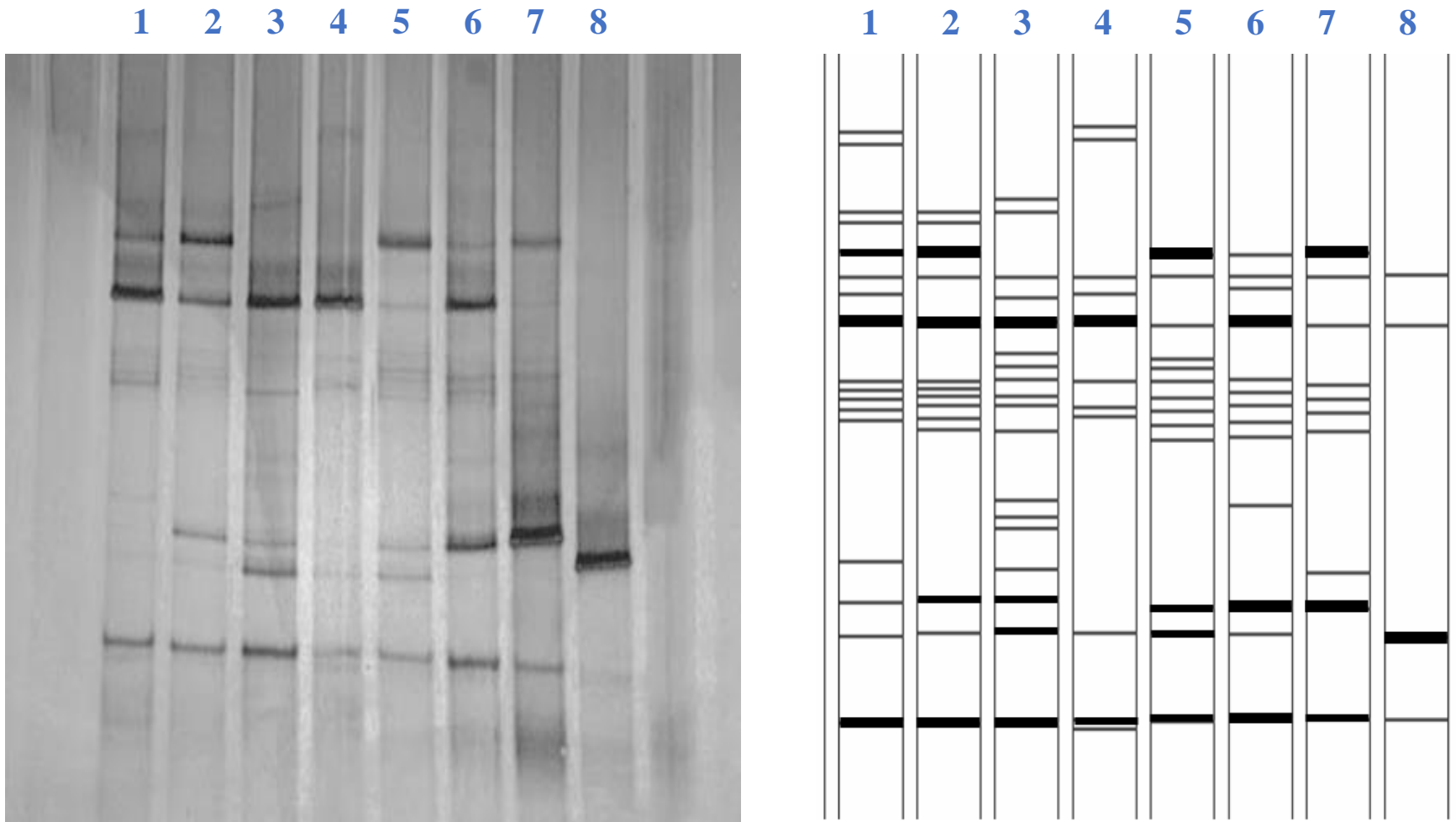


Figura 15. Patrón de bandas y perfil digital de DGGE del gen *rpoB* de los quesos de Bola de los distintos productores. 1: Ocosingo; 2: Laltic; 3: La Maya; 4: La Regional; 5: Dorados de la Selva; 6: Queshill; 7: Santa Rosa; 8: La Peña

8.4 Riqueza Específica: región V3 del DNAr 16S y *rpoB*

A partir del patrón de bandas de DGGE para la región V3 del DNAr 16S y para el gen *rpoB*, se realizó un análisis cuantitativo con el uso del programa ImageLab 6.0.1 para obtener información de riqueza específica y dominancia relativa para cada muestra (Tabla 13).

En un gel DGGE la riqueza específica corresponde a la cantidad de OTUs que componen la microbiota en una muestra y está en función al número total de bandas presentes en cada carril. Para el perfil de amplicones del gen de la región V3 del DNAr 16S se observó que los quesos de los productores Ocosingo, La Maya y La Regional, presentan una riqueza específica mayor en comparación a los demás productores, con un valor de 27 cada uno; seguido por La Peña y Queshill con valor de 25, Laltic y Santa Rosa con 25 y finalmente Dorados de la Selva con 22 OTUs registradas. En cuanto al perfil del gen *rpoB* se observó que los quesos de los productores La Maya, Ocosingo y Laltic, presentan una riqueza específica mayor en comparación a los demás productores con un valor de 18, 17 y 14 OTUs, respectivamente, seguidos por La Regional y Dorados de la Selva con valor de 13 cada uno, mientras que Queshill, Santa Rosa y La Peña, con menos de 11 OTU's registrados.

Al comparar los datos de riqueza específica de ambas regiones amplificadas, se observó que la región V3 del DNAr 16S, presenta un valor superior de riqueza para todas las muestras comparado con el gen *rpoB*. Esto se podría explicar por la microheterogeneidad que se ha observado en el gen DNAr 16S, mientras que en el gen *rpoB* está presente en única copia en los microorganismos (Vos, 2012). Este fenómeno denominado microheterogeneidad intragenómica en la secuencia del ADNr 16S en genomas bacterianos, se produce cuando varias bandas provenientes de la misma especie migrarán diferencialmente en un análisis de PCR-DGGE. La heterogeneidad intraespecie produce la presencia de múltiples copias del gen ribosomal, resultado de una evolución diferencial.

En análisis previos del queso Bola de Ocosingo en Linares, (2022) se observó también que al analizar las muestras de la región V3 del ADNr 16S y *rpoB*, el análisis de la región V3 ADNr arroja una mayor riqueza específica comparada con el gen *rpoB* e incluso comparada con otras regiones del 16S, como la V4-V7 y V7-V8.

Tabla 13. Valores de riqueza específica y dominancia relativa del patrón de bandas DGGE de las muestras para cada productor.

Muestra	Región V3 del ADNr 16S			<i>rpoB</i>		
	Riqueza específica	IRp	Dominancia relativa	Riqueza específica	IRp	Dominancia relativa
Ocosingo	27	0.26039044	10	17	0.22908712	3
Laltic	24	0.27933088	8	14	0.31880014	4
La maya	27	0.31392081	10	18	0.30546583	6
La peña	25	0.18392116	6	4	0.28615225	1
La regional	27	0.28852396	10	13	0.32838554	3
Dorados de la Selva	22	0.44090914	12	13	0.35933869	4
Queshill	25	0.37739904	11	11	0.22067018	2
Santa Rosa	24	0.29915842	7	10	0.3100063	3

IRp: Intensidad relativa promedio

8.5 Dominancia Relativa: región V3 del DNAr 16S y gen *rpoB*

La dominancia relativa es un valor directamente relacionado con la intensidad que se puede observar en las bandas de un gel de DGGE, y corresponde al número de bandas cuya intensidad relativa (IR) se encuentran por encima de la intensidad relativa promedio (IRp) para cada carril. La IR se calcula seleccionando una banda de referencia por carril, ésta es la más intensa y se le confiere el número 1, a partir de esta banda de referencia el software ImageLab 6.0.1 otorga un valor menor a 1 de intensidad relativa para cada banda (Anexo F-G). En la Tabla 13, se muestra la dominancia relativa para cada muestra de queso analizada.

Para la región V3 del ADNr 16S las bandas dominantes para el queso Ocosingo, La Maya y La Regional fueron 27 en total; para La Peña y Queshill, 25; para Laltic t Santa Rosa con 24 y Dorados de la Selva con 22. En la figura 16, se observan los gráficos de dominancia relativa para la región V3 del ADNr 16S, en el cual las bandas cuyo valor se encuentran por encima de la línea punteada se consideran como dominantes, mientras que las que se encuentran por debajo se consideran como no dominantes. Se observa que algunas de las bandas dominantes se encuentran presentes en la mayoría de las muestras, estas corresponden a las bandas número: 3,4,27,28,31,38,44 y 61. Señálalas en las Figuras 14 y 15.

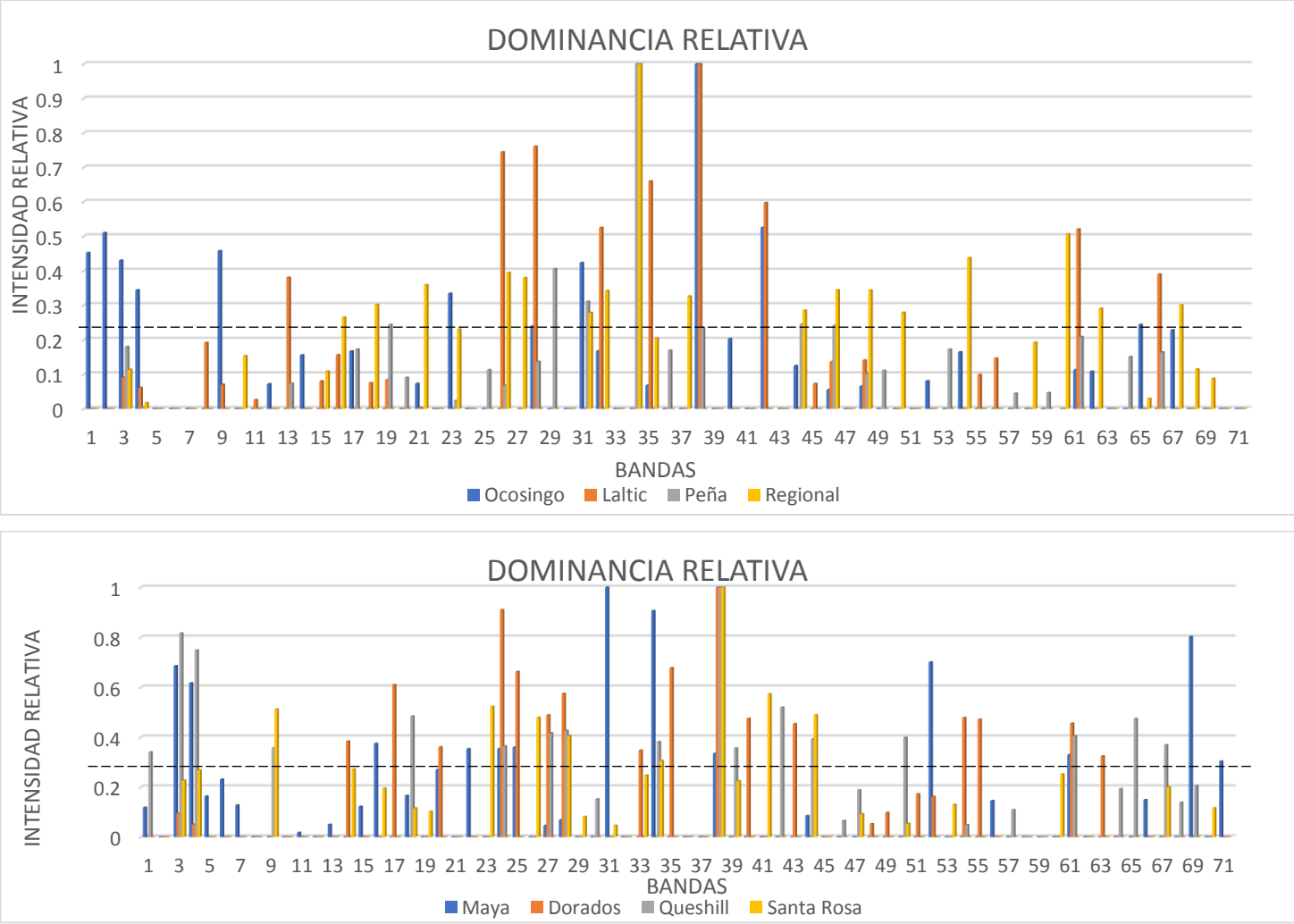


Figura 16. Dominancia relativa del perfil de bandas DGGE de la región V3 del ADNr 16S

En el caso del análisis del gen *rpoB* las bandas dominantes para el queso Ocosingo fueron 3 que corresponden a las bandas número 6,9,28; para Laltic 4, bandas número 6,9,26 y 28; Dorados de la Selva: 4, bandas número 6,26,27,28; La Regional: 3, bandas número 9,26,28; Santa Rosa: 3 con número 6,26,28; Queshill: 2, bandas 9 y 28 y finalmente, La Maya con 6, el cual obtuvo el mayor número de bandas dominantes: 9,10,12,26,27,28.

En la figura 17, se observan los gráficos de dominancia relativa, en el cual las bandas cuyo valor se encuentran por encima de la línea punteada se consideran como dominantes, mientras que las que se encuentran por debajo se consideran como no dominantes. Se observa una tendencia de bandas dominantes que se encuentran presentes en la mayoría de las muestras, corresponden a las bandas: 6,9,26, 27 y 28.

Similar a los datos que se obtuvieron con los valores de riqueza específica, al comparar los datos de dominancia relativa de ambas regiones amplificadas, se observó que la región V3 del DNAr 16S presenta un valor superior de bandas dominantes para todas las muestras, comparado con el gen *rpoB*. Lo mismo observado en los análisis del queso Bola de Ocosingo en Linares, (2022) donde se observó que al analizar las muestras de la región V3 del ADNr 16S y *rpoB*, de la misma forma la región V3 presenta un mayor número de bandas dominantes comparada con el gen *rpoB* y las regiones del 16S V4-V7 y V7-V8.

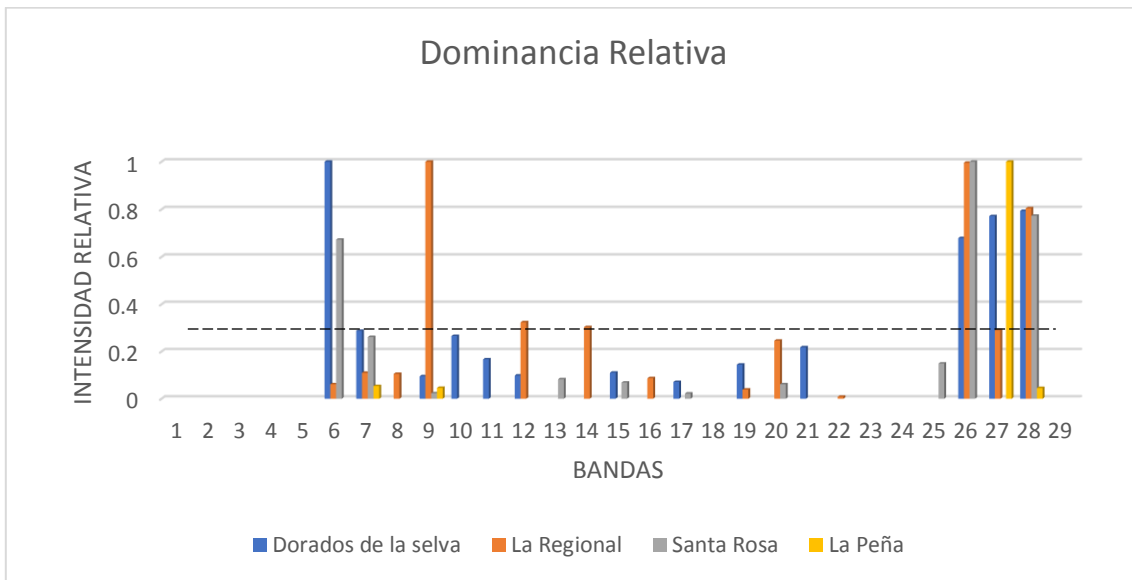
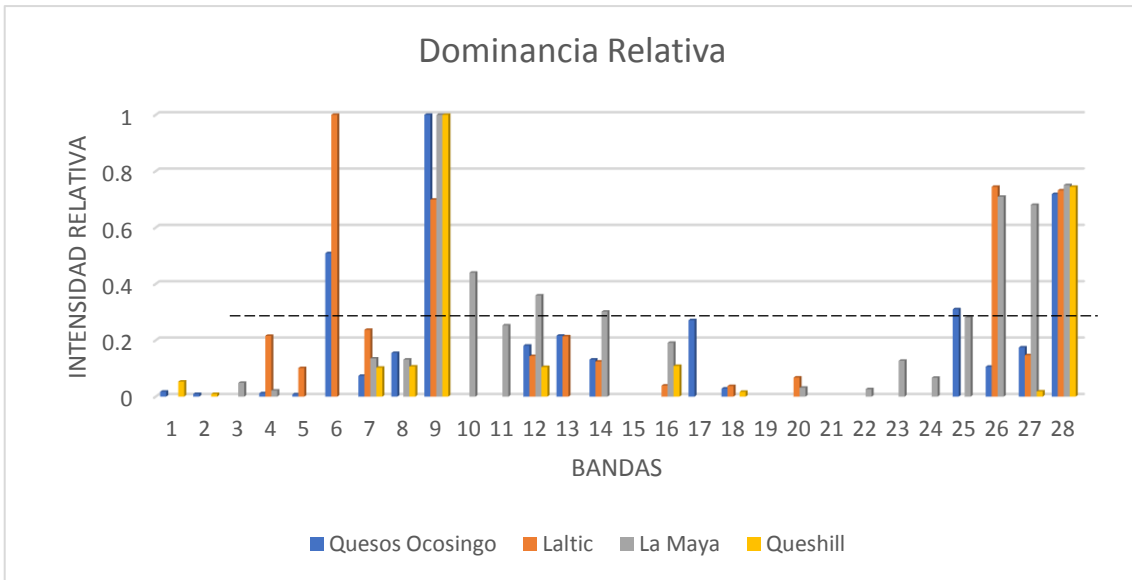


Figura 17. Dominancia relativa del perfil de bandas DGGE del gen *rpoB*

8.6 Análisis de agrupamiento UPGMA para las muestras analizadas con amplicones de la región V3 del DNAr 16S y del gen ribosomal *rpoB*

Un análisis clúster o de agrupamiento es un método matemático principalmente utilizado para la formación de grupos similares mediante la determinación de la Unidad Básica de Caracterización (Johnson, 1998). Se han desarrollado herramientas que permiten obtener agrupaciones a partir de secuencias de nucleótidos de ADN (Nei & Miller, 1990). Debido a las características especiales de estos datos, se han desarrollado métodos ideales para poder analizarlos. Estos generalmente, son usados para estudios filogenéticos (Marker, 2021).

Se analizan mediante matrices binomiales de presencia/ausencia de bandas de huellas de ADN o de proteínas, obtenidas por electroforesis. El índice más adecuado de utilizar es la fórmula desarrollada por Dice (1945), que, aunque fue desarrollada originalmente con fines de comparación de nichos ecológicos, Nei y Li (1979) demostraron, mediante desarrollos matemáticos, que era el índice más congruente para la clasificación mediante características similares.

Para el análisis de clúster de ambos genes analizados se elaboró un cotejo de todas las bandas presentes en cada una de las muestras. Para la región V3 del DNAr 16S se contaron un total de 71 bandas y se registraron en una matriz binaria de ausencia (0) y presencia (1) por cada carril. Para el gen *rpoB* se contaron un total de 29 bandas y se registraron en una matriz binaria de ausencia (0) y presencia (1) por cada carril. Con el uso del software PAST 4.05 se calcularon a partir de los valores, los índices de similitud Sörensen-Dice y Jaccard, para conocer las similitudes que existen en las muestras con base en el patrón de bandas del DGGE analizado con la región V3 del ADNr 16S y *rpoB*. El análisis con ambos índices se utiliza para confirmar los valores de similitud y construir el dendrograma más certero. Para cada amplicón analizado en ambos índices de similitud, se observa una correlación en los valores mostrados.

Para la región V3 del ADNr 16S en ambos índices de similitud utilizados, Sörensen-Dice y Jaccard, se observa el valor más alto para las muestras de Ocosingo y La

Regional, lo que significa una mayor similitud entre ambas muestras comparada con las demás; por otra parte, el valor más bajo corresponde para Santa Rosa-Dorados de la Selva, lo que significa que son las muestras con menor similitud entre ellas. En el caso del gen *rpoB* en ambos índices se observa el valor más alto para Laltic y Queshill como las muestras con mayor similitud, mientras que el valor más bajo para Santa Rosa y La Regional, lo que significa que son las muestras con menor similitud (Tabla 14, 15, 16 y 17).

Tabla 14. Valores de índice de DICE para la región V3 del ADNr 16S

DICE	Ocosingo	Laltic	La Maya	La Peña	La Regional	Dorados de la Selva	Queshill	Santa Rosa
Ocosingo	1	0.3600	0.40741	0.3846	0.5185	0.4489	0.4230	0.3529
Laltic	-----	1	0.3600	0.3750	0.4000	0.2666	0.2916	0.2553
La Maya	-----	-----	1	0.3461	0.4074	0.4081	0.4230	0.3137
La Peña	-----	-----	-----	1	0.3461	0.3404	0.3200	0.4081
La Regional	-----	-----	-----	-----	1	0.2040	0.4615	0.5098
Dorados de la Selva	-----	-----	-----	-----	-----	1	0.3404	0.1739
Queshill	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1	0.4081
Santa Rosa	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1

Tabla 15. Valores de índice de JACCARD para la región V3 del ADNr 16S

JACCARD	Ocosingo	Laltic	La Maya	La Peña	La Regional	Dorados de la Selva	Queshill	Santa Rosa
Ocosingo	1	0.2195	0.2558	0.2380	0.3500	0.2894	0.2682	0.2142
Laltic	-----	1	0.2195	0.2307	0.2500	0.1538	0.1707	0.1463
La Maya	-----	-----	1	0.2093	0.2558	0.2564	0.2682	0.1860
La Peña	-----	-----	-----	1	0.2093	0.2051	0.1904	0.2564
La Regional	-----	-----	-----	-----	1	0.1136	0.3000	0.3421
Dorados de la Selva	-----	-----	-----	-----	-----	1	0.2051	0.0952
Queshill	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1	0.2564
Santa Rosa	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1

Tabla 16. Valores de índice de DICE para el gen *rpoB*

DICE	Ocosingo	Laltic	La Maya	La Peña	La Regional	Dorados de la Selva	Queshill	Santa Rosa
Ocosingo	1	0.5806	0.5945	0.6428	0.6000	0.5161	0.4444	0.5714
Laltic	-----	1	0.4705	0.4800	0.5925	0.7857	0.6666	0.3200
La Maya	-----	-----	1	0.4516	0.7272	0.5294	0.3333	0.5806
La Regional	-----	-----	-----	1	0.5000	0.4800	0.2857	0.3636
Dorados de la Selva	-----	-----	-----	-----	1	0.5925	0.4347	0.5000
Queshill	-----	-----	-----	-----	-----	1	0.7500	0.3200
Santa Rosa	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1	0.3809
La Peña	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1

Tabla 17. Valores de índice de JACCARD para el gen *rpoB*

JACCARD	Ocosingo	Laltic	La Maya	La Peña	La Regional	Dorados de la Selva	Queshill	Santa Rosa
Ocosingo	1	0.4090	0.4230	0.4736	0.4285	0.3478	0.2857	0.4
Laltic	-----	1	0.3076	0.3157	0.4210	0.6470	0.5000	0.1904
La Maya	-----	-----	1	0.2916	0.5714	0.3600	0.2000	0.4090
La Regional	-----	-----	-----	1	0.3333	0.3157	0.1666	0.2222
Dorados de la Selva	-----	-----	-----	-----	1	0.4210	0.2777	0.3333
Queshill	-----	-----	-----	-----	-----	1	0.6000	0.1904
Santa Rosa	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1	0.2352
La Peña	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1

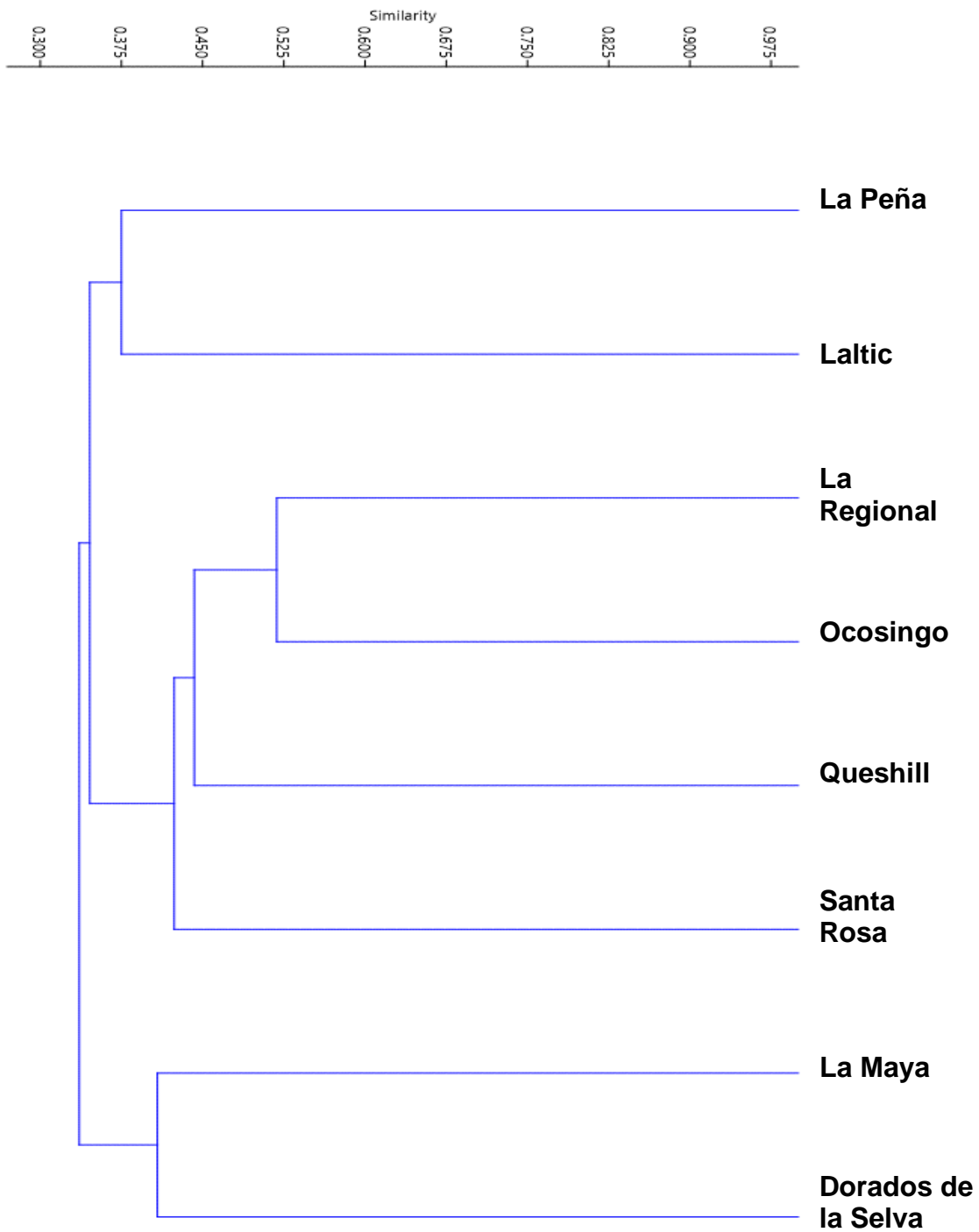
A partir de los valores de los índices de similitud, se construyó el dendrograma, utilizando como método de agrupamiento, UPGMA. Este método asume que los OTUs son grupos por sí mismas, luego relaciona los dos grupos más cercanos basado en la matriz de distancias, recalcula la matriz de distancia y repite el proceso hasta que todas las especies estén conectadas a un único grupo. El método UPGMA realiza el dendrograma con la matriz calculada, hallando la relación entre las OTUs (Risjani & Abidin, 2020). El método de UPGMA para ambos amplicones fue elaborado con el uso del software PAST 4.05.

En la construcción del dendrograma por UPGMA para la región V3 del ADNr 16S se observa el agrupamiento de las muestras de acuerdo con su similitud, de esta manera se establecieron 2 grupos bien definidos (Figura 18). El primer grupo, se divide en dos ramificaciones donde en una se encuentran La Regional y Ocosingo como las muestras más parecidas, con un valor de índice de Dice de 0.518; seguidas de Queshill y Santa Rosa. Por otra parte, agrupa a La Peña y Laltic con un valor de índice de Dice de 0.375. En el segundo grupo se encuentran La Maya y Dorados de la Selva con un valor de 0.408. Contemplando el patrón de bandas de

las muestras de queso Ocosingo de distintos productores, se puede sugerir que los diferentes productores presentan diferencias significativas en cuanto a su microbiota bacteriana.

De la misma forma que se observó para la región V3 del DNAr 16S, para el gen *rpoB*, también se establecieron 2 grupos bien definidos. El primer grupo, se divide en dos ramificaciones donde en una se encuentran La Maya y Dorados de la Selva con un valor de índice de Dice de 0.727, seguida de La Peña; por otra parte, agrupa a La Regional y Ocosingo con un valor de índice de Dice de 0.642. En el segundo grupo se encuentran Laltic y Queshill como las muestras más parecidas con un valor de 0.785, seguida de Santa Rosa (Figura 19).

Al comparar los dendrogramas de ambos amplicones analizados, se observó que algunas de las agrupaciones fueron similares. En ambos casos se agrupó a las muestras de los productores La Maya con Dorados de la Selva, La Regional con Ocosingo, dejando en el mismo grupo a Queshill y Santa Rosa. Lo que parece haber una relación de agrupamiento de acuerdo con la antigüedad de la quesería donde fueron elaborados. En la parte histórica del proceso de elaboración del Queso Bola de Ocosingo, se destaca la participación de varias queserías que se consideran pioneras en su elaboración. De acuerdo con el gobierno de Chiapas, Ocosingo, las queserías con más años de antigüedad en la elaboración del queso Bola son Laltic, Queshill y Santa Rosa con experiencia de por lo menos más de 60 años, posteriormente surgieron queserías como La Regional, La Peña y Ocosingo con casi 40 años de antigüedad y finalmente, La Maya y Dorados de la Selva se posicionan como las queserías más recientes, con al menos 10 años de antigüedad. Lo que resulta bastante interesante ya que se puede proponer que por el patrón de bandas o bien la composición microbiológica, se pueden diferenciar los quesos de acuerdo con la experiencia de *saber-hacer* entre los diferentes productores. Lo cual se corrobora con la secuenciación e identificación de la microbiota presente en cada queso.



16S
Figura 18. Análisis de agrupamiento UPGMA para las muestras de los diferentes productores del queso Bola de Ocosingo utilizando amplicones obtenidos del gen V3- en DGGE

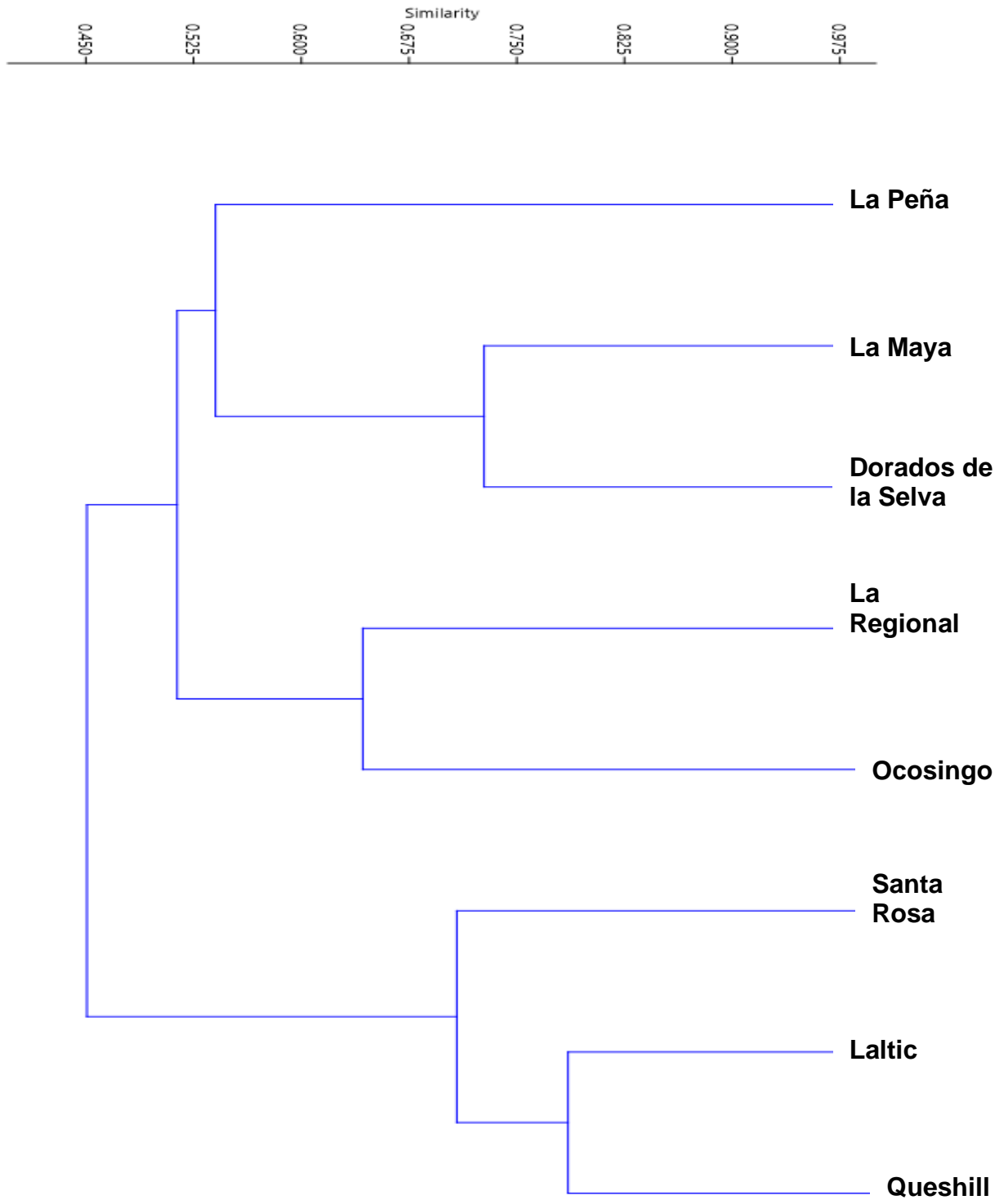


Figura 19. Análisis de agrupamiento UPGMA para las muestras de los diferentes productores del queso Bola de Ocosingo utilizando amplicones obtenidos del gen *rpoB*.

8.7 Selección del gen para el análisis de la microbiota bacteriana del Queso Bola de Ocosingo

Debido a los efectos que la pandemia de la COVID-19 generó en la investigación, anteriormente mencionado, se sugirió que el análisis de la microbiota bacteriana a nivel molecular se realizara únicamente con un gen.

Para conocer que gen analizado podría brindar una mayor información de la composición de la microbiota bacteriana de las muestras de queso Bola de Ocosingo, se procedió a realizar una comparación de los valores obtenidos mediante el análisis de los amplicones para la región V3 del ADNr 16S y el gen *rpoB*, ambos genes utilizados ampliamente en enfoques moleculares para la investigación de la diversidad de BAL en el entorno del queso artesanal y para su seguimiento dentro de este complejo ecosistema (Randazzo, *et al.*, 2006).

En un análisis cuantitativo para comparar la información de riqueza específica y dominancia relativa para cada muestra entre los diferentes genes, se puede observar que el análisis de la microbiota a partir del gen de la región V3 del ADNr 16S presentan una riqueza específica mayor en comparación al *rpoB* con un valor de 71, mientras que el *rpoB* mostro una riqueza específica de 29. En cuanto a la dominancia relativa de las diferentes muestras se cuantificaron para *rpoB* en promedio un total de 3 bandas dominantes por productor y para DNAr 16S se mostraron en promedio 9 bandas dominantes.

De acuerdo con los análisis previamente mostrados, se consideró la selección del gen *rpoB* para continuar los análisis de la microbiota bacteriana de todos los Quesos de Bola para los diferentes productores. Esto debido a que el perfil de DGGE presentó un menor número de bandas comparado con el DNAr 16S. Los resultados sugieren que se presenta el fenómeno de microheterogeneidad intragenómica que presenta el gen 16S. Además, esto se corroboró en la visualización de la presencia de algunas bandas intensas en *rpoB* y no en DNAr 16S, esto se podría explicar a que sólo se tiene una copia del gen *rpoB* por OTU; mientras que con la región V3 del ADNr 16S se podría tener múltiple bandas, es decir, que varias bandas podrían

representar la misma OTU, pero por las múltiples copias, características del gen, migran diferencialmente a lo largo del gel, separando así esta banda intensa y visualmente la observamos como muchas bandas tenues con diferente posición.

Deperrois-Lafarge & Meheut, (2012) realizaron una evaluación del gen *rpoB* como alternativa al gen de la región V3 del ADNr 16S para la identificación de especies bacterianas en leche y productos lácteos. Realizaron la extracción de ADN obtenido de cepas de diferentes especies bacterianas, posteriormente fue amplificado por PCR utilizando cebadores *rpoB*. A continuación, los productos de PCR de cada especie bacteriana se separaron en un gel DGGE. Los perfiles de DGGE con *rpoB*, comprendían menos bandas que los perfiles DNAr 16S, como se observó en esta investigación, y eran más fáciles de analizar. El análisis DGGE también mostró una sola banda para los amplicones del gen *rpoB* por cada especie bacteriana (Figura 20).

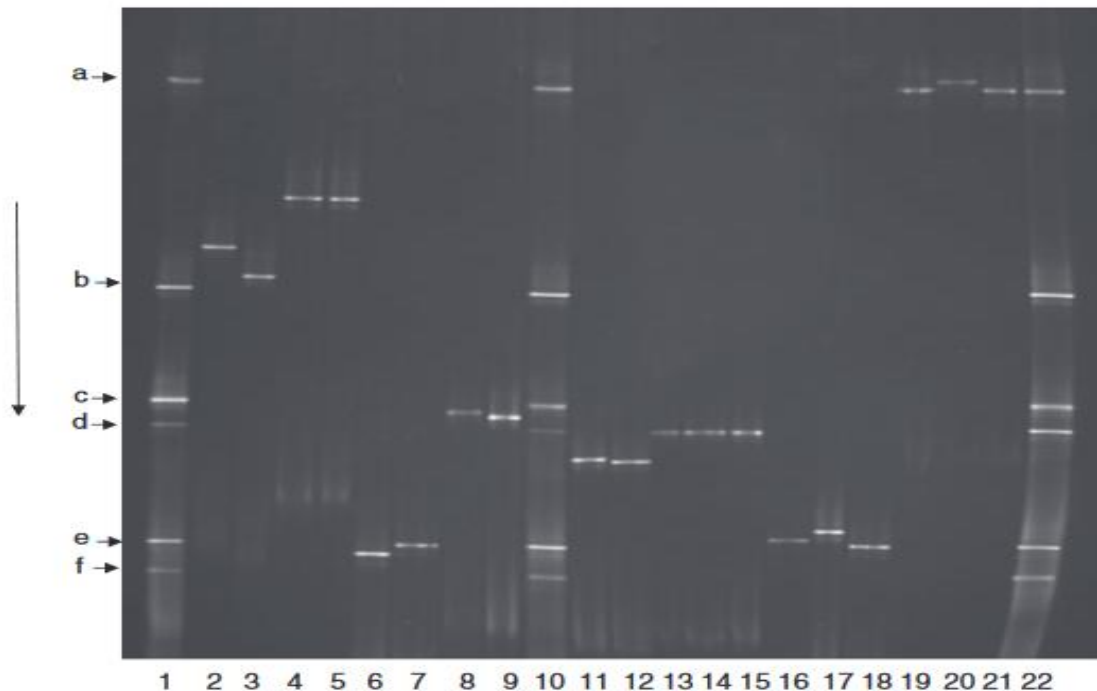


Figura 20. Perfiles DGGE de regiones del gen *rpoB* obtenidos de diferentes cepas bacterianas, se muestra una única banda por cepa. Tomada de Deperrois-Lafarge & Meheut, 2012.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran el poder discriminatorio del gen *rpoB*, indicando que puede ser utilizado como una alternativa al gen DNAr 16S para la identificación de especies bacterianas en leche y derivados lácteos.

La PCR-DGGE dirigida al gen *rpoB* es una forma de discriminar las especies bacterianas que hubieran presentado co-migraron de amplicones del gen DNAr 16S y, por lo tanto, evitaría la secuenciación de las bandas que llevaran a la misma OTU (Renouf, *et al.*, 2006). La selección del gen *rpoB* para los análisis de esta investigación, también se consideró debido a que Linares, (2022) determinando la composición de la microbiota bacteriana de un queso Bola de Ocosingo del productor “Laltic” mediante el análisis en DGGE con amplificaciones de diferentes genes, observó que la riqueza específica era mayor en la muestra del gen DNAr 16S y menor en el análisis del amplicón *rpoB*. Seleccionó bandas para identificación, sin embargo, una vez secuenciadas las bandas de interés, determinó que con el gen DNAr 16S se logró la identificación únicamente a nivel de género. Por otro lado, con el gen *rpoB*, las bandas para secuenciar lograron una identificación de 5 OTUs todos a nivel de especie. La comparación de los perfiles de la comunidad reveló que los métodos eran complementarios.

El gen de la subunidad beta de la ARN polimerasa, *rpoB*, es un gen de una sola copia a diferencia de la región V3 del ADNr 16S. Múltiples copias de la región V3 del gen DNAr 16S en genomas bacterianos complican las evaluaciones de diversidad realizadas a partir de perfiles de DGGE. El uso del gen *rpoB* ofrece una mejor alternativa al gen DNAr 16S de uso común para análisis de comunidades microbianas basados en DGGE (Peixoto, *et al.*, 2002). Esta comparación nos permite discernir de la confiabilidad para realizar análisis con el gen *rpoB*, ya que nos brinda una noción más detallada de la composición de la microbiota presente, debido a que se llega a una identificación a nivel de especie, por ser de única banda el análisis resultaría más eficaz y menos laborioso ya que no se identificaría especies repetidas, sin embargo, uno de los problemas para ser utilizado como gen

blanco en distintos estudios taxonómicos, es que no existe una base de datos suficientemente amplia.

8.8 Selección, escisión y reamplificación de ADN extraído de bandas individuales

Con el fin de identificar la microbiota bacteriana presente en los Quesos de Bola de diferentes productores, se procedió a seleccionar las bandas de interés a partir del gel de DGGE que se obtuvo con los amplicones del gen *rpoB*. Fueron seleccionadas las bandas que presentaban una mayor intensidad, lo que sugiere la predominancia de esa OTU en el queso, las bandas que estuvieran presentes en todas las muestras y, además, se seleccionaron bandas que fueran representativas para cada productor. Para los productores Ocosingo, Laltic y La Maya se seleccionaron un total de 6 bandas, para Dorados de la Selva, Queshill y Santa Rosa 5 bandas, La Regional 4 y La Peña 3 bandas. En la tabla 18, se muestran el total de bandas seleccionadas y el código designado para su identificación.

En total se cortaron 40 bandas bien definidas del gel DGGE (Figura 21). Cada banda seleccionada se cortó y se reamplificó con los cebadores sin grapa. La PCR se realizó en las mismas condiciones que la PCR-DGGE. Estos productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5%, se observó una única banda del tamaño esperado por lo que se realizó la purificación directamente del producto de PCR (Figura 22).

Tabla 18. Bandas seleccionadas para secuenciar.

PRODUCTOR	BANDAS (CÓDIGO)
Ocosingo	OM01 - OM06
Laltic	LM07 - LM12
La Maya	MM13 - MM18
La Regional	RM19 - RM22
Dorados de la Selva	DM23 - DM27
Queshill	QM28 - QM32
Santa Rosa	SM33 - SM37
La Peña	PM38 - PM40

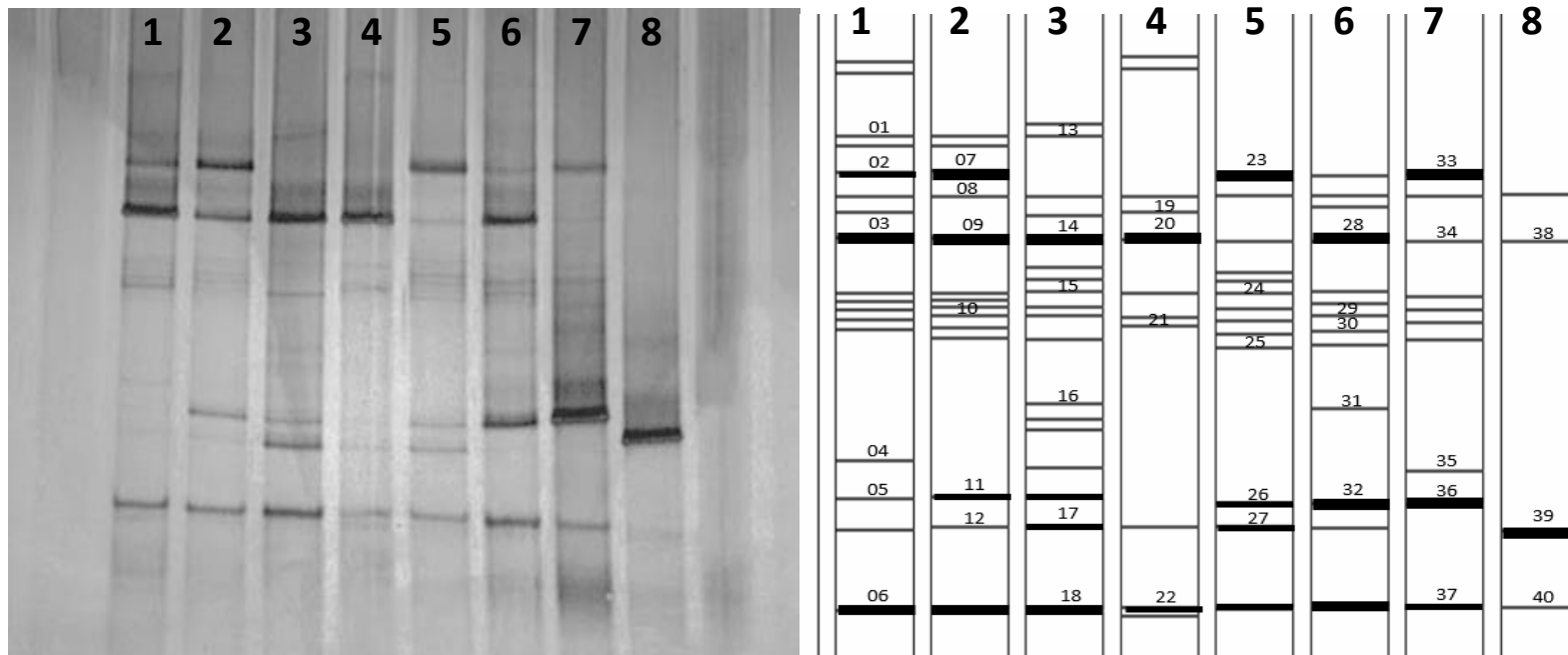


Figura 21. Bandas seleccionadas para secuenciar a partir de DGGE realizado con amplificaciones del gen *rpoB*: 1. Ocosingo; 2. Laltic; 3. La Maya; 4. La Regional; 5. Dorados de la Selva; 6. Queshill; 7. Santa Rosa; 8. La Peña

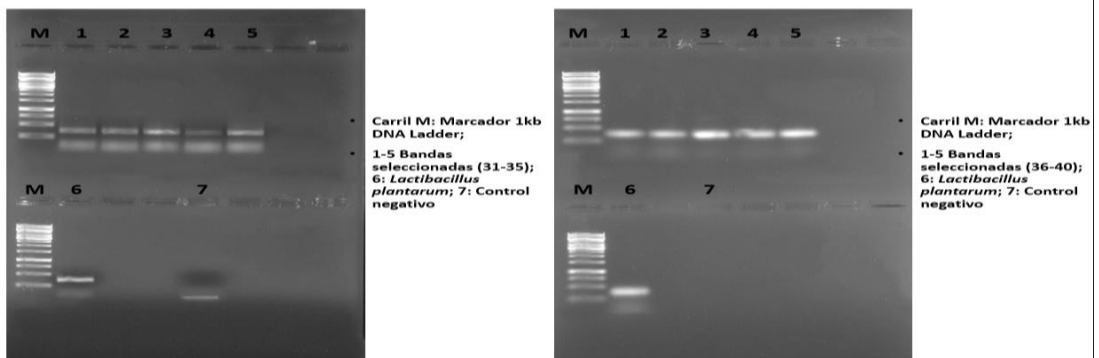
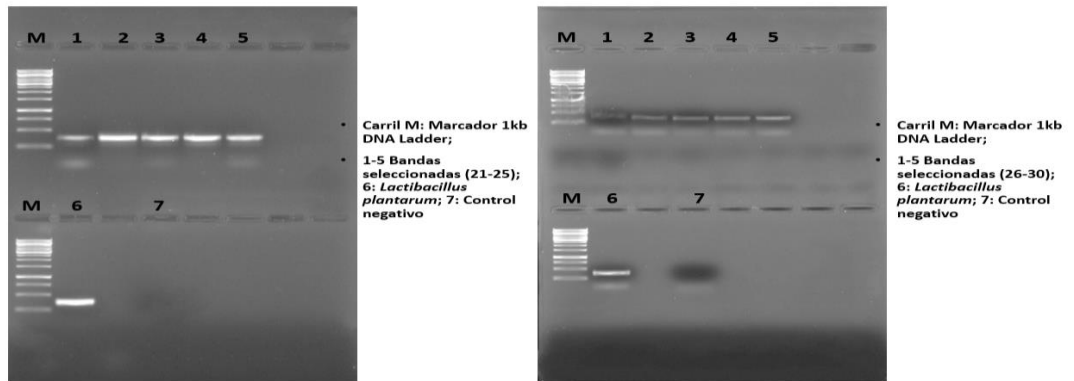
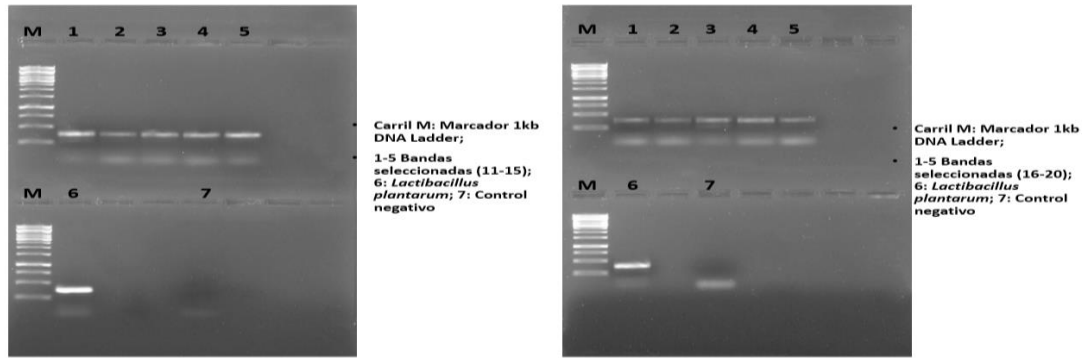
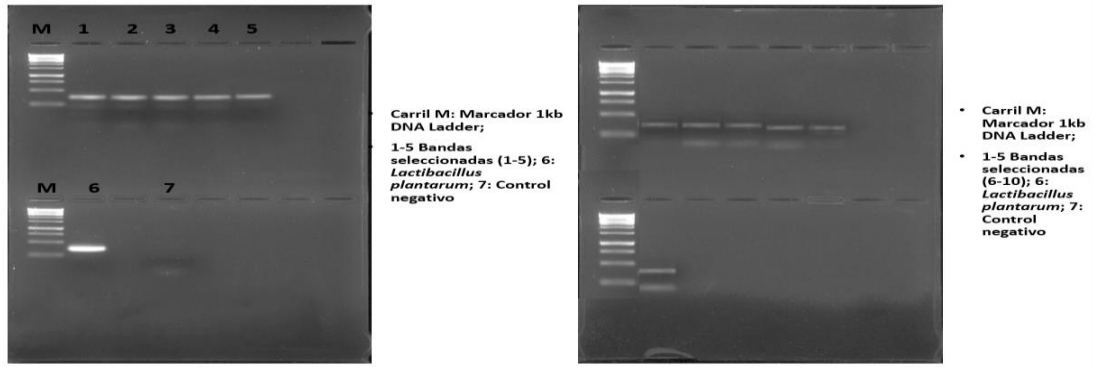


Figura 22. Amplicones del gen *rpoB*, para las 40 bandas seleccionadas para secuenciar. En gel de agarosa al 1.5%. 6 μ L por carril.

Debido a que en algunos casos las bandas se encontraban poco definidas y demasiado juntas, dificultó una extracción limpia, por lo que se procedió a realizar una clonación de cada una de las bandas. Clonar es una alternativa bastante frecuente, utilizada como método de separación para resolver el problema de co-migración observadas en perfiles de DGGE (Iacumin, *et al.*, 2020).

A partir del ADN extraído de las bandas escindidas de DGGE, se realizó otro paso de reamplificación con el uso de cebadores sin grapa, se purificó el amplicón, se clonó el fragmento en pJET1.2/blunt y se transformó *E. coli* competente. El vector utilizado contiene un gen letal que se interrumpe con la ligadura de un inserto de ADN en el sitio de clonación. Finalmente, sólo las células bacterianas con plásmidos recombinantes podrán formar colonias. Esta selección positiva permite acelerar el proceso de identificación de las colonias transformadas con inserto (Thermofisher, 2021). De las células transformadas se cultivaron 3 colonias de cada muestra, para posteriormente seleccionar una y realizar la extracción del plásmido. Para corroborar el tamaño y linearizar las construcciones se realizó una digestión para cada plásmido (Fig. 23).

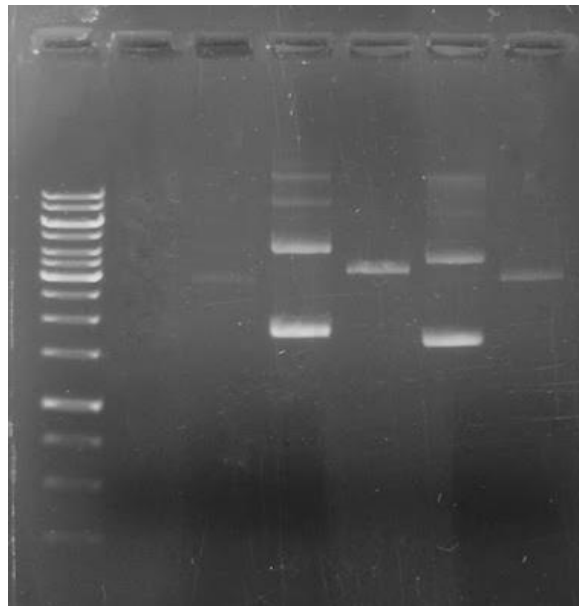


Figura 23. Digestión de vector vacío y con inserto. Gel de agarosa 1%.

Las 40 construcciones obtenidas fueron reamplificadas con los cebadores sin grapa. Se observaron en gel de agarosa para corroborar integridad y tamaño. Posteriormente, se realizó el corte de banda a partir del gel de agarosa y se purificó el producto de PCR (Figura 24). La concentración se ajustó a 40 ng/μL para ser enviadas a secuenciar a la compañía MAGROGEN, ubicada en Corea. Los amplicones purificados fueron secuenciados usando el cebador *rpoB*, y las secuencias resultantes se compararon con los reportados en el NCBI GenBank, utilizando la Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamiento Local (del inglés Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) (Altschul, *et al.*, 1990). Además, las bandas DGGE bien resueltas y definidas se utilizaron como criterio para estimar el dominio relativo de una población determinada con respecto a las bandas menos definidas y tenues.

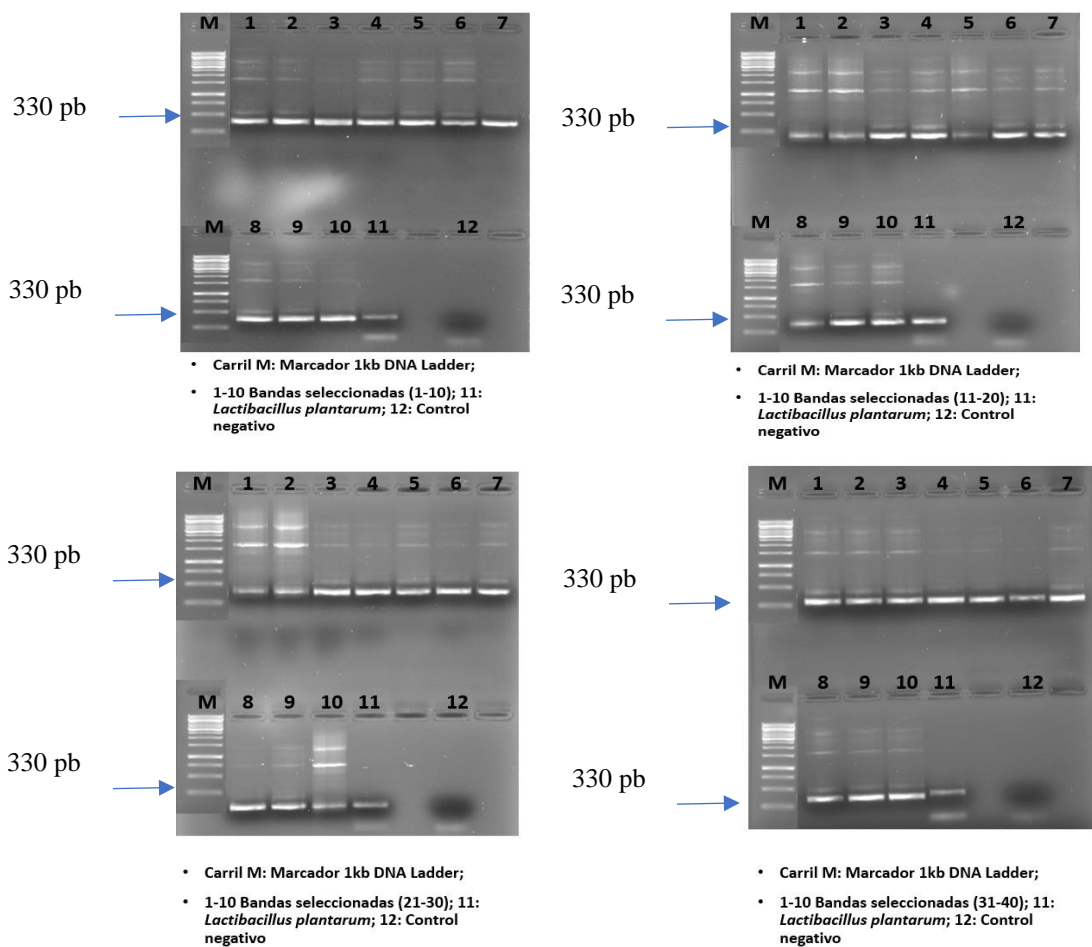


Figura 24. Amplicones del gen *rpoB*, de las 40 construcciones de clonación. Gel de agarosa al 1.5%. 6μL por carril.

8.9 Análisis de secuencias e Identificación de microbiota bacteriana

El gen *rpoB* se ha utilizado para identificar y clasificar especies bacterianas y se ha demostrado que es más discriminativo que la región V3 del gen DNAr 16S (Deperrois-Lafarge & Meheut, 2012). La identificación de la microbiota bacteriana se hizo mediante una comparación de la secuencia obtenida con secuencias de referencia de una base de datos. La herramienta utilizada fue BLAST que trabaja con la base de datos GenBank. Los electroferogramas de cada amplicón se muestran en el Anexo I. Los resultados de las identificaciones para cada banda seleccionada se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Identificación de la microbiota bacteriana a partir del patrón de bandas en gel DGGE.

Productor	Código	Identidad	e-valor	Cobertura (%)	Identidad (%)
Ocosingo	OM01	<i>Streptococcus parasuis</i>	2 E ⁻¹⁴⁶	92	94.30
	OM02	<i>Serratia marcescens</i>	1 E ⁻¹³³	100	100
	OM03	<i>Streptococcus parasuis</i>	6 E ⁻¹⁴¹	100	99.64
	OM04	<i>Streptococcus parasuis</i>	1 E ⁻¹³⁸	96	94.03
	OM05	<i>Streptococcus parasuis</i>	1 E ⁻¹²⁸	93	94.03
	OM06	<i>Streptococcus parasuis</i>	1 E ⁻¹³⁸	88	94.03
Laltic	LM07	<i>Serratia marcescens</i>	6 E ⁻¹⁴⁶	100	99.66
	LM08	<i>Enterobacter bugandensis</i>	4 E ⁻¹³⁸	100	99.28
	LM09	<i>Streptococcus parasuis</i>	1 E ⁻¹³³	100	99.63
	LM10	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	8 E ⁻¹⁴⁵	100	100
	LM11	<i>Streptococcus parasuis</i>	1 E ⁻¹³⁴	96	94.03
	LM12	<i>Streptococcus parasuis</i>	2 E ⁻¹⁴¹	95	94.03
La Maya	MM13	<i>Streptococcus parasuis</i>	2 E ⁻¹³⁶	96	94.03
	MM14	<i>Streptococcus parasuis</i>	8 E ⁻¹⁴¹	100	99.29
	MM15	<i>Citrobacter freundii</i>	3 E ⁻¹³⁹	100	100
	MM16	<i>Streptococcus infantarius</i>	2 E ⁻¹³⁵	100	100
	MM17	<i>Streptococcus parasuis</i>	5 E ⁻¹⁵³	94	94.72
	MM18	<i>Streptococcus parasuis</i>	5 E ⁻¹⁴⁸	96	94.03
La Regional	RM19	<i>Enterococcus faecium</i>	4 E ⁻¹⁵⁴	99	97.67
	RM20	<i>Streptococcus parasuis</i>	1 E ⁻¹⁴¹	100	99.64
	RM21	<i>Streptococcus parasuis</i>	1 E ⁻¹⁵³	95	94.49
	RM22	<i>Streptococcus parasuis</i>	6 E ⁻¹⁵²	95	94.49
Dorados de la Selva	DM23	<i>Streptococcus parasuis</i>	3 E ⁻¹⁴⁵	89	94.75
	DM24	<i>Citrobacter freundii</i>	8 E ⁻¹⁵⁰	100	99.66
	DM25	<i>Streptococcus parasuis</i>	4 E ⁻¹⁴⁹	93	94.38
	DM26	<i>Streptococcus parasuis</i>	2 E ⁻¹⁵⁶	96	94.81
	DM27	<i>Streptococcus parasuis</i>	2 E ⁻¹⁵¹	95	94.46
Queshill	QM28	<i>Streptococcus parasuis</i>	1 E ⁻¹¹⁷	95	98.57
	QM29	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	8 E ⁻¹⁴⁵	100	99.29
	QM30	<i>Streptococcus parasuis</i>	5 E ⁻¹⁴⁸	90	94.81
	QM31	<i>Streptococcus infantarius</i>	1 E ⁻¹⁴²	100	100
	QM32	<i>Streptococcus parasuis</i>	8 E ⁻¹⁵¹	93	94.65
Santa Rosa	SM33	<i>Streptococcus parasuis</i>	6 E ⁻¹⁵⁷	95	95.04
	SM34	<i>Streptococcus parasuis</i>	1 E ⁻¹⁵⁴	93	99.64
	SM35	<i>Streptococcus parasuis</i>	5 E ⁻¹⁴⁸	93	94.03
	SM36	<i>Streptococcus parasuis</i>	3 E ⁻¹⁶⁰	96	95.34
	SM37	<i>Streptococcus parasuis</i>	1 E ⁻¹⁵⁴	93	95.21
La Peña	PM38	<i>Streptococcus parasuis</i>	3 E ⁻¹³⁹	100	98.60
	PM39	<i>Streptococcus parasuis</i>	1 E ⁻¹³⁷	100	98.93
	PM40	<i>Streptococcus parasuis</i>	6 E ⁻¹⁴¹	100	99.64

En el caso de los resultados arrojados por el BLAST, la similitud de la secuencia problema con la secuencia de referencia, indicada por la base de datos está representada por el porcentaje de identidad, así la identidad es más certera mientras más se acerque al 100%. El porcentaje de cobertura nos indica la cantidad de nucleótidos comparados en toda la secuencia, en cuanto al valor E representa el número de alineamientos con un score equivalente o superior que se pueden presentarse por azar. De esta forma la interpretación del valor E, indica que tan confiable es el alineamiento obtenido, siendo los valores cercanos a cero los que indican menor posibilidad de obtención del resultado por azar (Escobar-Zepeda, et al., 2018).

Las bandas con el código OM02, OM03, LM07, LM08, LM09, LM10, MM14, MM15, MM16, RM20, DM24, QM29, QM31, SM34 y PM40, fueron las que obtuvieron los resultados más certeros, ya que el porcentaje de identidad fue de 99.28-100% y el porcentaje de cobertura fue del 100%. Las bandas con en 100% de identidad fueron identificadas como *Lactiplantibacillus plantarum* (anteriormente, *Lactobacillus plantarum* Zheng, et al., 2020), *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* y *Streptococcus infantarius*. *Enterococcus faecium*, *Enterobacter bungandensis* y *Streptococcus parasuis*, fueron identificadas con un porcentaje de identidad del 97.67, 99.28% y 99.64%, respectivamente.

En general, para la mayoría de las bandas los resultados obtenidos presentaron un porcentaje de identidad de 94%. El porcentaje de identidad fue variable entre las demás bandas analizadas, un total de 4 bandas presentaron un porcentaje de identidad de 97.67-98.93% y 21 bandas con un porcentaje de 94.03 – 95.34%.

El gen *rpoB* contiene regiones conservadas y variables alternas. Se han utilizado diferentes fragmentos del gen *rpoB* para analizar bacterias dentro del mismo grupo o dentro de grupos estrechamente relacionados. El corte utilizado para la identificación de bacterias basado en la secuencia del gen *rpoB* depende del fragmento utilizado para la identificación: para 600–825 pb, la designación más

acertada de la especie se basa en una similitud de secuencia del fragmento de al menos 96–97%; para 300–600 pb, como es el caso de los amplicones de ADN de los Queso Bola de Ocosingo analizados en este estudio, una similitud de secuencia del fragmento de al menos 94-95% es necesario para una identificación a nivel de especie (Adékambi, 2009). Para una designación correcta a nivel de género se basa en una similitud de secuencia del fragmento del gen *rpoB* de al menos $\geq 85.5\%$ (Case, *et al.*, 2007).

De acuerdo con el patrón de bandas en el gel de DGGE, comparado con las secuencias identificadas, se observó una tendencia de co-migración para varias bandas. *Streptococcus parasuis* fue la especie que se identificó en la mayoría de las bandas, con un total de 30. Sin embargo, se observó que la mayoría migró diferencialmente a lo largo del gel de DGGE.

De estas 30 bandas identificadas como *S. parasuis*, 9 bandas presentaron un porcentaje de cobertura e identidad elevado, prácticamente 100%, lo que se considera una identificación certera. Estas bandas corresponden a las bandas dominantes seleccionadas y que se encontraban presentes en todas las muestras analizadas. Las 21 bandas restantes identificadas como *S. parasuis* presentaron un valor de identidad del 94-95%, el valor límite mínimo para considerar una identificación a nivel de especie con el uso del gen *rpoB* (Bou, *et al.*, 2011).

En cuanto a las bandas identificadas como la misma especie, pero que se observaron en distintas condiciones desnaturalizantes, se atribuye principalmente a amplificaciones incompletas en la reacción en cadena de la polimerasa. Se ha observado en algunos análisis que, al momento de realizar la amplificación, ésta no se desarrolla por completo en toda la longitud del fragmento analizado. Todos los amplicones analizados en teoría tienen el mismo tamaño, sin embargo, por estas amplificaciones incompletas, a las secuencias podrían faltarles algunos pares de bases, por lo que dichas secuencias quedarán más cortas, de esta manera los tamaños dejarán de ser iguales y al momento de correr los amplicones en el gel de

DGGE, los pares de bases faltantes producirán diferencias en cuanto a la longitud de migración (Salipante & Jerome, 2020). Otra probable circunstancia, puede estar asociada a una posible mutación del gen *rpoB*, dichas mutaciones se han observado en la identificación de la especie *Mycobacterium tuberculosis* (Ma, *et al.*, 2021).

Para corroborar la identidad de la microbiota bacteriana identificada en este estudio, asignada mediante las secuencias contenidas en las bandas, se procedió a realizar un análisis de agrupamiento para poder obtener un árbol consenso, el cual se obtuvo por el método de neighbor-joining con un remuestreo de 1000 repeticiones, para su realización se utilizó el programa Molecular Evolutionary Genetics MEGA11 (Tamura, *et al.*, 2007). Fueron comparadas las 40 secuencias obtenidas contra algunas secuencias de referencia del GenBank que corresponden a especies con alta similitud al grupo de bacterias que se identificaron. El agrupamiento para todas las secuencias se realizó mediante un análisis para bacterias Gram positivas (uno para agrupar las especies *Streptococcus* y otro para agrupar *Lactiplantibacillus* y *Enterococcus*) y Gram negativas.

El análisis de agrupamiento para las bacterias Gram negativas encontradas se muestra en la Figura 25. *Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, pertenece al phylum Firmicutes, por lo que su secuencia fue utilizada de grupo externo para dar mayor robustez al análisis. La agrupación de las secuencias de las bandas OM02, LM07, LM08, MM15 y DM24, se llevó a cabo por un análisis de Bootstrap con 1000 remuestreos. Fueron utilizadas las cepas de referencia de las siguientes especies: *Citrobacter freundii* (cepa JXJ4, L75 y CF48846), *Citrobacter braakii* (cepa 910, DSM17596 y 237), *Enterobacter bugandensis* (cepa EB247, 1497 y XL95), *Enterobacter hormaechei* (cepa 467 y ATCC49163), *Serratia marcescens* (cepa 448, S7.1 y DSM20081) y *Serratia rubidaea* (cepa TA26, PGPRB y 455) obtenidas de GenBank. Este análisis coloca a la banda MM15 y QM24, identificadas como *Citrobacter freundii* dentro del género *Citrobacter*, especie *C. freundii*, por lo que se podría dar certeza de su identificación a nivel de especie. Para el caso de la banda LM08 identificada como *Enterobacter bugandensis*, se agrupa dentro del

género *Enterobacter*, especie *E. bugandensis*, lo que se considera una identificación a nivel de especie correcta. Para las bandas OM02 y LM07, identificadas como *Serratia marcescens*, fueron clasificadas en el género *Serratia*, especie *S. marcescens*, corroborando su identificación a nivel de especie.

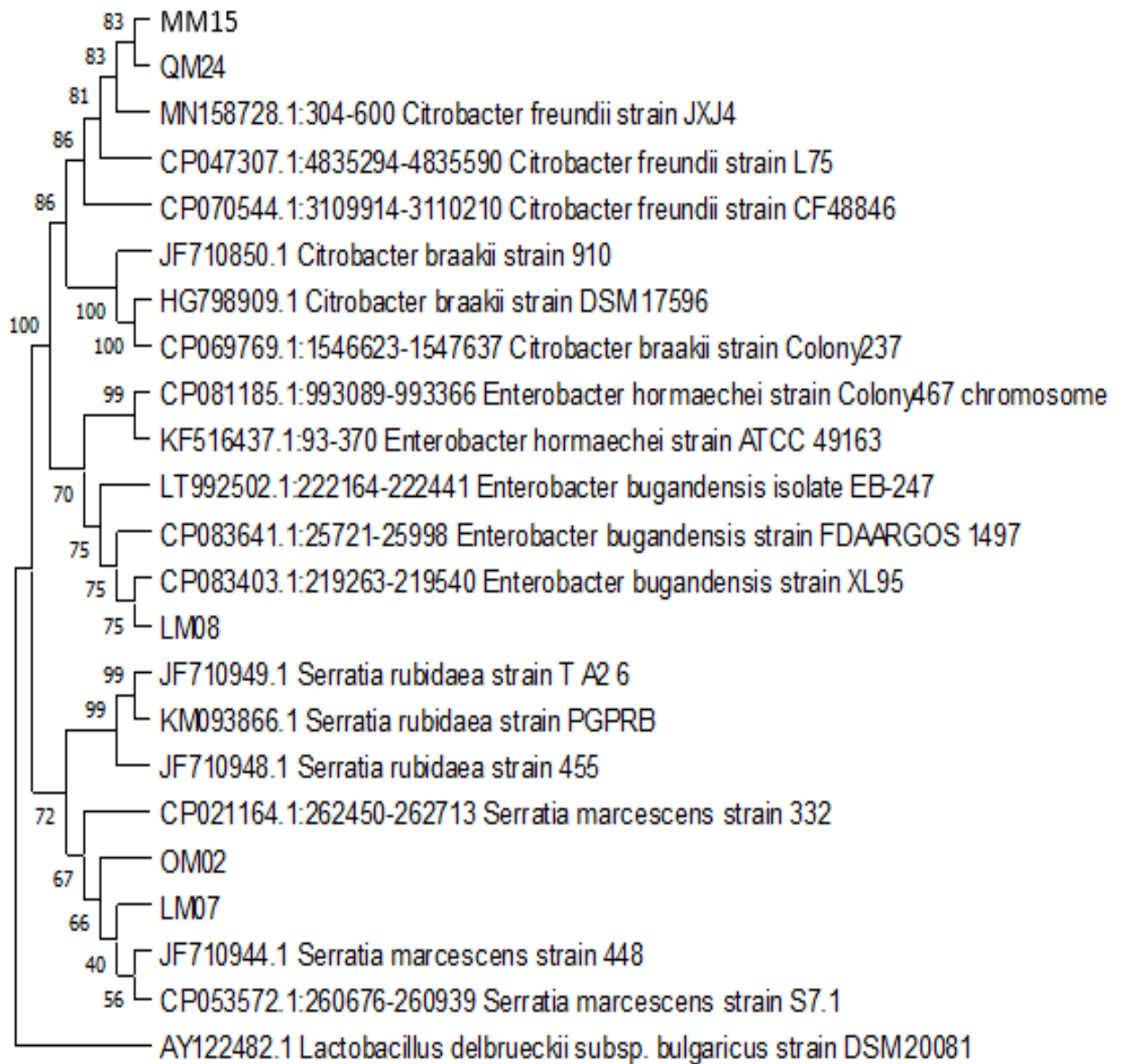


Figura 25. Relación filogenética de bacterias Gram negativas identificadas por la secuencia parcial del gen *rpoB* en el análisis del Queso Bola de Ocosingo. Se infirió utilizando el método Neighbor-Joining El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestra el valor junto al nodo donde derivan las ramas del árbol. La relación filogenética se calculó usando el método Tamura-Nei, con un remuestreo de 1000.

En el análisis de agrupamiento para las bacterias Gram positivas, para los lactobacillaceae encontrados, se muestra en la Figura 26. *Escherichia coli* D24692 pertenece al phylum Proteobacteria, por lo que su secuencia fue utilizada de grupo externo para dar mayor robustez al análisis. La inferencia filogenética de las secuencias de las bandas LM10, DM29 y MM19, se llevó a cabo por un análisis de Bootstrap con 1000 remuestreos. Fueron utilizadas las cepas de referencia de las siguientes especies: *Lactiplantibacillus plantarum* (cepa Heal19 y DSM8862), *Lactiplantibacillus paraplantarum* (cepa NBRC107151 y Lp109), *Enterococcus faecium* (cepa 3815 y KACC15689) y *Enterococcus faecalis* (cepa 20478 y SB2C2), obtenidas de GenBank. Este análisis agrupa a la banda LM10 y DM29, identificadas como *Lactiplantibacillus plantarum*, dentro del género *Lactiplantibacillus*, especie *L. plantarum*, por lo que se podría dar certeza de su identificación a nivel de especie. Para el caso de la banda MM19, identificada como *Enterococcus faecium*, se agrupa dentro del género *Enterococcus*, especie *E. faecium*, lo que corrobora su identificación a nivel de especie.

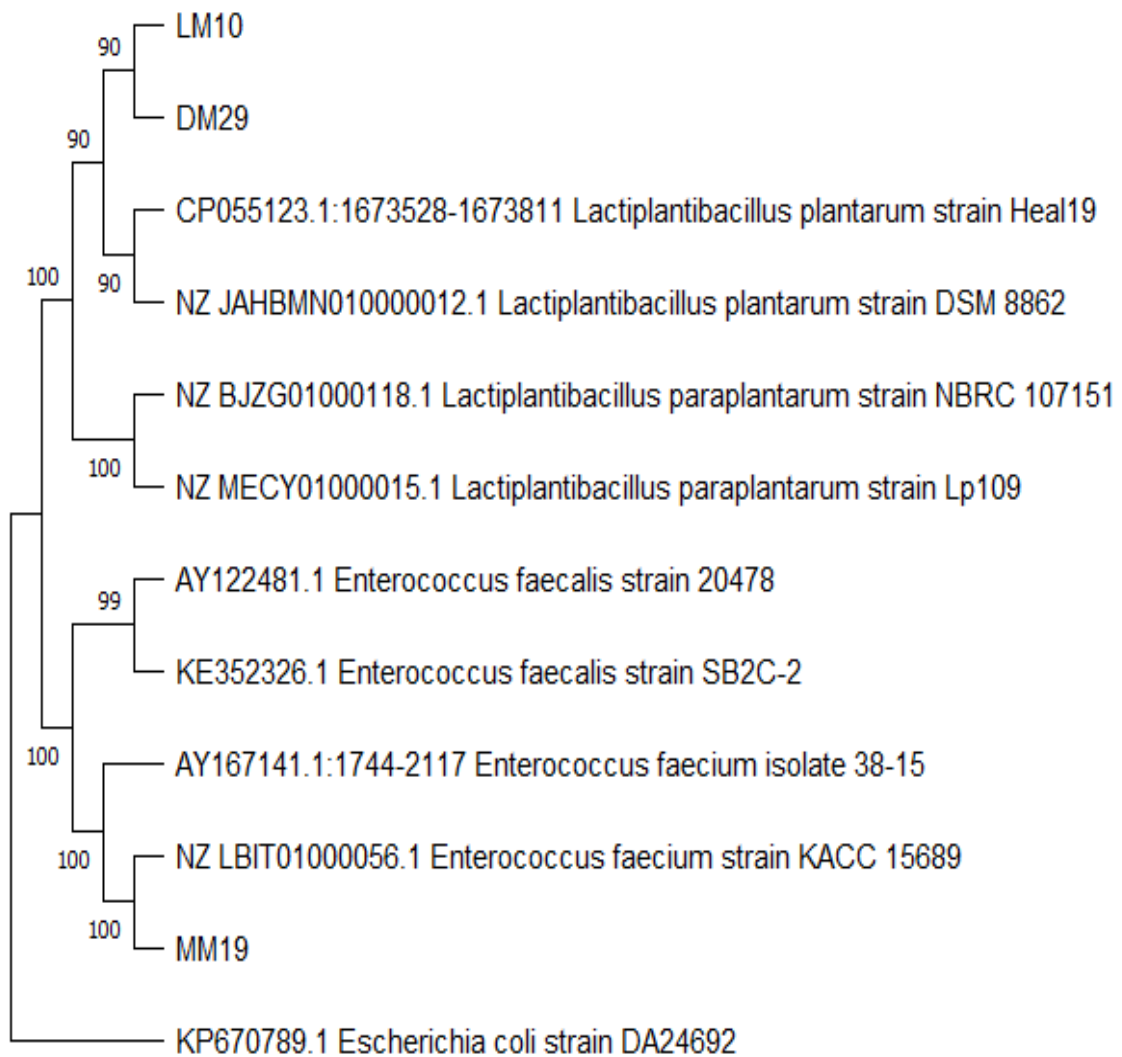


Figura 26. Relación filogenética de bacterias Gram positivas identificadas por la secuencia parcial del gen *rpoB* en el análisis del Queso Bola de Ocosingo. Se infirió utilizando el método Neighbor-Joining. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestra el valor junto al nodo donde derivan las ramas del árbol. La relación filogenética se calculó usando el método Tamura-Nei, con un remuestreo de 1000 bootstrap.

En el caso del análisis de agrupamiento para las bacterias Gram positivas, para los *Streptococcus* encontrados, se muestra en la Figura 27. *Escherichia coli* D24692 pertenece al phylum Proteobacteria, por lo que su secuencia fue utilizada de grupo externo para dar mayor robustez al análisis. La inferencia filogenética para este género fue realizada utilizando las secuencias de las bandas identificadas con una identidad mayor al 98%, las secuencias con porcentaje menor al 97% fueron descartadas ya que la diferencia en sus secuencias no permitía dar robustez al análisis. Se utilizaron las secuencias de las bandas OM03, LM09, MM14, MM16, RM20, QM28, QM31, SM34, PM38, PM39 y PM40, la inferencia se llevó a cabo por un análisis de Bootstrap con 1000 remuestreos. Fueron utilizadas las cepas de referencia de las siguientes especies: *Streptococcus parasuis* (cepa BS26 y H35), *Streptococcus suis* (cepa 9401240 y NT77), *Streptococcus infantarius* (cepa CJ18 y BAA102) y *Streptococcus equinus* (cepa 399 y ATCC9812), obtenidas de GenBank. Este análisis agrupa a las bandas OM03, LM09, MM14, RM20, QM28, SM34, PM38, PM39 y PM40, identificadas como *Streptococcus parasuis* dentro del género *Streptococcus*, especie *S. parasuis*, por lo que se podría dar certeza de su identificación a nivel de especie. Para el caso de las bandas MM16 y QM31, identificadas como *Streptococcus infantarius*, se agrupa dentro del género *Streptococcus*, especie *S. infantarius* subsp. *infantarius*, lo que corrobora su identificación a nivel de especie.

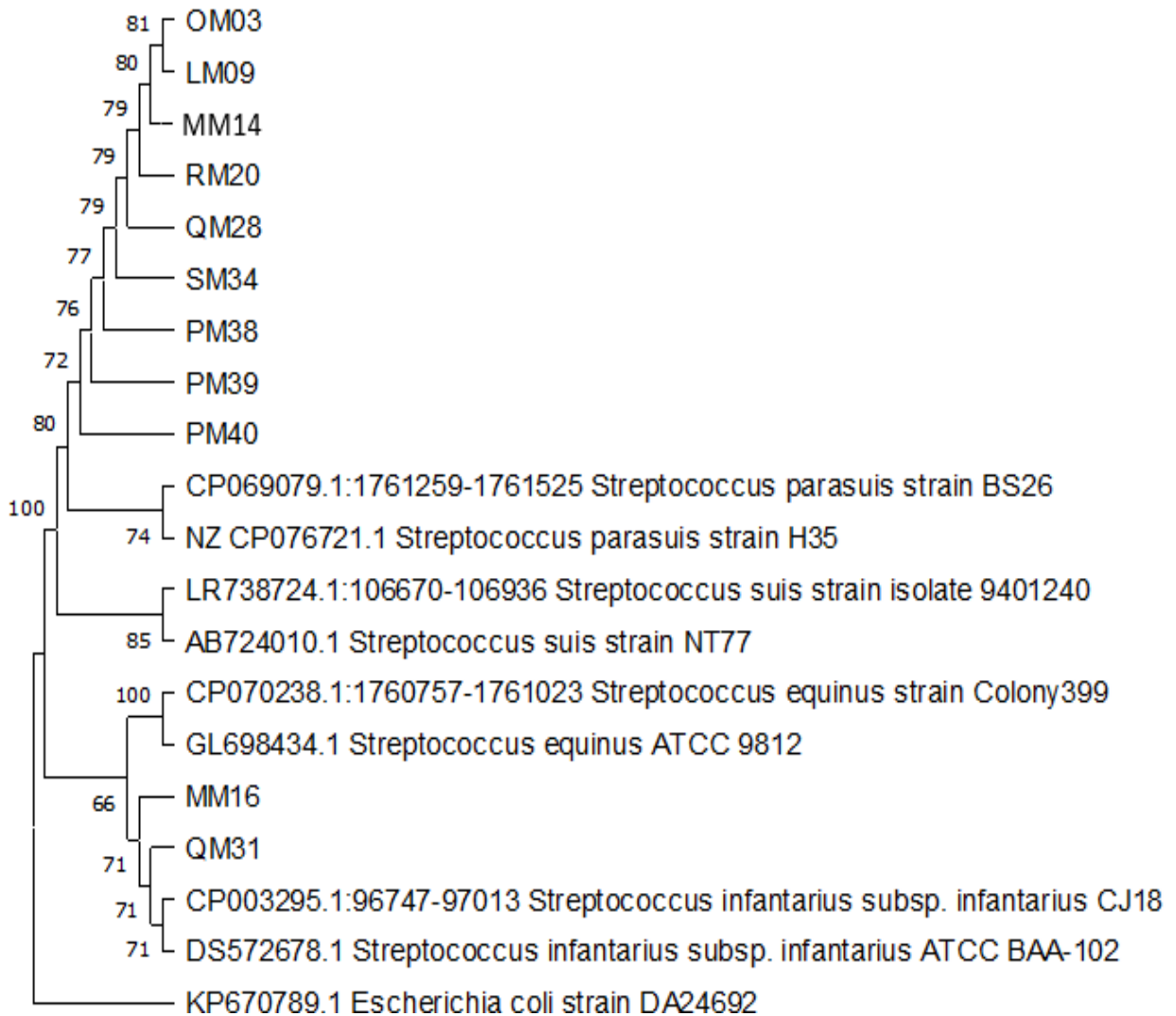


Figura 27. Relación filogenética de bacterias Gram positivas identificadas por la secuencia parcial del gen *rpoB* en el análisis del Queso bola de Ocosingo. Se infirió utilizando el método Neighbor-Joining. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon se muestra el valor junto al nodo donde derivan las ramas del árbol. Las relación filogenética se calculó usando el método Tamura-Nei con un remuestreo de 1000.

Por otra parte, las secuencias de *Streptococcus parasuis* descartadas, que por su porcentaje de identidad es dudosa su identificación a nivel de especie, fueron comparadas para poder determinar las diferencias entre ellas. La inferencia filogenética de las secuencias de las bandas OM01, OM04, OM05, OM06, LM11, LM12, MM13, MM17, MM18, RM21, RM22, DM23, DM25, DM26, DM27, QM30, QM32, SM33, SM35, SM36 y SM37, se llevó a cabo por un análisis de Bootstrap con 1000 remuestreos. Sin embargo, el árbol filogenético obtenido fue poco robusto (no mostrado), en el cual no era posible realizar una agrupación de estas secuencias en la especie en la que fue identificada. Posteriormente, se realizó una comparación de las secuencias obtenidas con una secuencia de referencia de *Streptococcus parasuis*, para conocer el número de pb en las que son diferentes.

De este conjunto de muestras descartadas, se realizó una comparación mediante alineamiento de secuencias con la cepa de referencia *Streptococcus parasuis* H35, se observó que las secuencias que corresponden a las muestras DM27 y RM22, fueron las que presentaron menos diferencias con un total de 3 bases, lo que nos permitiría considerar correcta la identificación a nivel de especie, sin embargo, se analizaron otras secuencias que por la cantidad de bases diferentes, únicamente se considera correcta su identificación a nivel de género (Tabla 20).

Tabla 20. Comparación de secuencias de *S. parasuis* del conjunto de muestras descartadas aisladas del queso Bola de Ocosingo comparadas con una cepa de referencia *S. parasuis* H35.

Secuencias similares de <i>S. parasuis</i> aisladas del Queso Bola de Ocosingo	No. bases diferentes respecto a cepa de referencia <i>S. parasuis</i> H35	Determinación
DM27 y RM22	3	Correcta identificación a nivel de especie
LM11 y LM12	4	Correcta identificación únicamente a nivel de género.
QM30 y SM35	4	Correcta identificación únicamente a nivel de género.
SM36 y QM32	4	Correcta identificación únicamente a nivel de género.
SM33	4	Correcta identificación únicamente a nivel de género.
DM26 y MM18	5	Correcta identificación únicamente a nivel de género.
DM25 y MM13	6	Correcta identificación únicamente a nivel de género.
DM23	8	Correcta identificación únicamente a nivel de género.
OM01	10	Correcta identificación únicamente a nivel de género.
MM17 y OM06	11 y 13	Correcta identificación únicamente a nivel de género.
OM04 y OM05	13	Correcta identificación únicamente a nivel de género.

9. Análisis de las especies bacterianas identificadas en los Queso Bola de Ocosingo en los diferentes productores.

De las 40 bandas seleccionadas del perfil de DGGE, se pudieron identificar en total 6 diferentes géneros de bacterias. *Streptococcus* como el género identificado en la mayoría de las bandas seleccionadas, está presente en todos los productores analizados y de bandas dominantes, en conjunto con *Serratia*. Entre los géneros de bandas no dominantes y encontrados en menor cantidad, se identificaron *Lactiplantibacillus*, *Enterococcus*, *Citrobacter* y *Enterobacter*.

En el análisis del Queso Ocosingo, se identificaron como especies dominantes *Streptococcus parasuis* y *Serratia marcescens*. Considerando las bandas no secuenciadas, pero que fueron identificadas en otra muestra y que migraban en una misma posición, se infiere la presencia de otras especies no dominantes: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter bugandensis*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*.

En el queso Laltic se identificaron como especies dominantes *Serratia marcescens* y *Streptococcus parasuis*. En las bandas no dominantes se identificaron *Enterobacter bugandensis* y *Lactiplantibacillus plantarum*. Considerando las bandas no secuenciadas, se infiere la presencia de otra especie no dominante: *Citrobacter freundii*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en Linares, (2022) donde se realizó una identificación de la microbiota bacteriana del queso Ocosingo elaborado por el productor Laltic. Con la región V4-V7 y V7-V8 del gen de la región V3 del ADNr 16S se identificó como bacteria dominante a *Streptococcus spp.* Con la región V3 de este mismo gen, también se identificó como dominantes a *Streptococcus spp.*, *Enterobacter spp.* y *Serratia spp.* Al utilizar un fragmento del gen *rpoB* se identificó a *Serratia marcescens*. Sin embargo, se identificaron otras especies como *Lactococcus garvieae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter Iwoffii* y *Escherichia spp.* que no fueron identificadas en esta investigación.

En el producto La Maya se identificó como especie dominante a *Streptococcus parasuis*. En las bandas no dominantes se identificaron *Streptococcus infantarius* y *Citrobacter freundii*. Considerando las bandas no secuenciadas, se infiere la presencia de otras especies no dominantes: *Enterobacter bugandensis* y *Enterococcus faecium*.

En el queso La Regional se identificó como especie dominante a *Streptococcus parasuis*. En las bandas no dominantes se identificó *Enterococcus faecium*. Considerando las bandas no secuenciadas, se infiere la presencia de otras especies no dominantes: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter bugandensis*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*.

En el queso Dorados de la Selva se identificó como especie dominante a *Streptococcus parasuis*. En las bandas no dominantes se identificó a *Citrobacter freundii*. Considerando las bandas no secuenciadas, se infiere la presencia de otras especies no dominantes: *Enterobacter bugandensis* y *Lactiplantibacillus plantarum*.

En el queso Queshill se identificó como especie dominantes a *Streptococcus parasuis*. En las bandas no dominantes se identificaron *Streptococcus infantarius* y *Lactiplantibacillus plantarum*. Considerando las bandas no secuenciadas, se infiere la presencia de otras especies no dominantes: *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter bugandensis* y *Enterococcus faecium*.

En cuanto a Santa Rosa y La Peña, para ambos productos todas las bandas seleccionadas que migraron diferencialmente fueron identificados como *Streptococcus parasuis*. Considerando las bandas no secuenciadas, se infiere la presencia de otras especies no dominantes: *Enterobacter bugandensis* y *Lactiplantibacillus plantarum* (esta última, únicamente para Santa Rosa).

En un panorama general de la microbiota bacteriana del Queso Bola de Ocosingo analizada en distintos productores, se considera variada. Las especies bacterianas

encontradas pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas y coliformes. Entre las especies BAL, *Streptococcus parasuis* se colocó como la especie dominante y presente en todas las muestras de queso para todos los productores. *S. infantarius*, se identificó como especie no dominante y se encontró únicamente en 2 muestras de queso La Maya y Queshill. *Enterococcus faecium* se identificó como especie no dominante, encontrada en La Regional, Queshill, Ocosingo y La Maya. *Lactiplantibacillus plantarum* se identificó como especie no dominante y se encontró en Laltic, Queshill, Ocosingo, La Regional, Dorados de la Selva y Santa Rosa.

En cuanto a las enterobacterias, *Serratia marcescens* también se identificó como especie dominante, sin embargo, se encontró únicamente en las muestras de Queso Ocosingo, Laltic y Queshill. *Citrobacter freundii* se identificó como especie no dominante, se encontró en La Maya, Dorados de la Selva, Ocosingo, Laltic, La Regional y Queshill. Finalmente, *Enterobacter bugandensis*, se identificó como especie no dominante y se encontró presente en todas las muestras. De acuerdo con la presencia de las distintas especies identificadas para todos los productores, se determinó como similares a los quesos Laltic-Ocosingo-Regional y La Maya-Dorados de la Selva, para estas dos últimas muestras se observó un agrupamiento similar por el método de UPGMA.

Como se ha mencionado anteriormente entre las especies BAL identificadas, para el caso de las muestras identificadas como *Streptococcus parasuis*, que se determinó en duda su identificación a nivel de especie, existe la posibilidad de que algunas de las bacterias encontradas sí pertenezcan a este género, pero podría tratarse de una especie diferente. Sin embargo, cabe mencionar que otra posibilidad podría estar relacionada con que se trate de *S. parasuis* de cepas diferentes, esto debido a que comparando las secuencias de *S. parasuis* identificadas entre los diferentes productores analizados, se observaron diferencias significativas entre las secuencias. Ya que en el análisis de alineamiento de secuencias se observaron diferencias de hasta 10 bases nucleotídicas.

Se procedió a realizar el análisis por Bootstrap. Se realizó un análisis de agrupamiento para poder obtener un árbol consenso, el cual se obtuvo por el método de neighbor-joining, elaborado con el software MEGA11. En el análisis de Bootstrap se obtuvo un árbol poco robusto (no mostrado) ya que existe diferencias en distintas posiciones de bases nucleotídicas, entre los amplicones de las 8 muestras de quesos. Se observó una tendencia de agrupación, en la cual las secuencias de *S. parasuis* de los Quesos Laltic y Queshill se agruparon como las más parecidas principalmente, junto con la secuencia de Santa Rosa (muestras LM11, LM12, QM30 y QM35). De esta manera es probable considerar que las cepas de estas muestras sean similares y es importante recordar que para estas muestras también se observó un agrupamiento por el método de UPGMA.

También se observó una agrupación de secuencias parecidas con las muestras del Queso La Maya y Dorados de la Selva; en otro conjunto se agrupó como similares a otras secuencias de La Maya y Dorados de la Selva, así mismo, se agrupó una secuencia de Dorados de la Selva con La Regional. Considerando estas agrupaciones, es posible deducir que sí se trate de *Streptococcus parasuis*, de una cepa diferente entre los distintos productores. En general se observó que principalmente, el queso Laltic y Queshill podrían compartir algunas mismas cepas de *S. parasuis*, al igual que los quesos de La Maya y Dorados de la Selva, podrían compartir mismas cepas de la especie.

Así mismo, esto se observó en *Streptococcus parasuis*; desde que se propuso como especie nueva, las características biológicas y patogénicas de *S. parasuis* no han quedado claras debido a la falta de un método de detección específico para esta especie, sin embargo, estudios corroboran la existencia de cepas diferentes en el grupo de *S. parasuis*, que no están relacionadas con patogenicidad (Wang, *et al.*, 2021).

De acuerdo con esta información, se puede considerar que existe variabilidad en cuanto a la microbiota bacteriana desarrollada entre los diferentes quesos Bola de

Ocosingo analizados. Se observó una tendencia frecuente en los quesos artesanales madurados, donde varias enterobacterias resultaron formar parte de la microbiota dominante o algunas bacterias asociadas a infecciones en ganado y humanos. No obstante, es importante recordar que el análisis con la técnica DGGE tiene ciertas limitaciones que nos impide poder distinguir si el ADN extraído de las muestras es recuperado de células viables o inviables. Esto se demuestra además por los análisis microbiológicos realizados por Camacho, (2019) y Linares, (2022) donde en ambos casos se identifica *Escherichia coli*. Un análisis está basado en métodos dependientes de cultivo, donde se mostró un nulo crecimiento de *E. coli*, mientras que, el otro análisis detecta su presencia mediante el uso de técnicas independientes de cultivo, lo que indica que en el producto final esta bacteria no es viable. Es probable que este microorganismo, al igual que las demás enterobacterias, en algún momento presentaban un conteo microbiológico elevado en la leche cruda, lo que resultaría en ADN presente en el queso. Sin embargo, por el proceso de elaboración, además de los procesos bioquímicos, fisicoquímicos y microbiológicos que involucra la maduración, es posible que se pierda la viabilidad de estos microorganismos.

De esta manera, se sugiere el desarrollo de más investigaciones enfocadas a las cepas de coliformes que participan en la microbiota natural de los productos lácteos fermentados, en particular el Queso Bola de Ocosingo. Los conocimientos que se obtendrán de estos estudios son cruciales para diseñar cultivos iniciadores locales que puedan ayudar a mejorar un producto estandarizado, la calidad de los alimentos y la seguridad alimentaria, ya que esta microbiota afecta sustancialmente las características del producto como el aroma, el sabor y la textura (Jans, *et al.*, 2017). Para desarrollar un producto inocuo, se sugieren inspecciones de algunos factores de virulencia, potencial de patogenicidad, actividad hemolítica, capacidad de formación de aminas biogénicas y resistencia a los antibióticos (Olivo, *et al.*, 2021; Zoumpopoulou, *et al.*, 2008).

10. Comentarios finales

Los resultados obtenidos en esta investigación podrían sugerir que no existe un riesgo para la salud del consumidor causado por el Queso Bola de Ocosingo, ya que la microbiota encontrada ha sido comúnmente reportada en este tipo de productos fermentados. Se ha observado que los factores de virulencia detectados en ese tipo de microbiota bacteriana, únicamente se relacionan con su capacidad de colonizar y no con su infectividad. Así mismo, se ha observado que la microbiota presente en alimentos fermentados, como los quesos madurados, podría tener un papel muy importante en el desarrollo de la inocuidad del producto, ya que algunas tienen la capacidad de sintetizar sustancias con actividad antibacteriana.

Investigaciones futuras podrán contribuir a una mejor comprensión de la interacción entre las enterobacterias y las bacterias del ácido láctico en los quesos madurados (Mladenović, *et al.*, 2018). Además, la determinación de las propiedades funcionales y probióticas de las bacterias ácido lácticas identificadas en los quesos Bola de Ocosingo, aumentará la demanda del consumo de este queso como un producto inocuo y saludable, así mismo, estas bacterias podrían desempeñar aplicaciones biotecnológicas que pueden ser utilizadas en diferentes tipos de alimentos fermentados.

11. Conclusiones

- ❖ Entre los productores del Queso Bola de Ocosingo existen distintos procesos de elaboración y tiempos de maduración del núcleo. Lo que se refleja en diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos de los quesos, incluso entre piezas de un mismo productor. Se diferenciaron tres grupos por similitud de las características de a_w , pH y acidez: Grupo 1: Laltic, La Peña y La Regional, grupo 2: Dorados de la Selva, Ocosingo, Santa Rosa y Queshill y grupo 3: La Maya (como el queso menos parecido comparado con los demás).
- ❖ El análisis DGGE a partir de la amplificación del gen *rpoB*, permitió agrupar en un análisis UPGMA, a los quesos Laltic-Queshill, Maya-Dorados de la Selva y Regional-Ocosingo como los más parecidos entre sí. En cuanto a la microbiota presente, se logró identificar como microorganismos dominantes *Streptococcus parasuis*, especie presente en todos los productores y *Serratia marcescens*, especie presente en el queso Ocosingo, Laltic y Queshill. Los microorganismos no dominantes identificadas pertenecen a *Lactiplantibacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus infantarius*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter bugandensis*. De acuerdo con la presencia de estas especies en los distintos productores, se determinó como similares a los quesos Laltic-Ocosingo-Regional y Maya-Dorados de la Selva.
- ❖ La microbiota identificada en el queso Bola de Ocosingo se ha reportado en otros quesos madurados elaborados de forma artesanal en el mundo.
- ❖ La presencia de enterobacterias no es deseable por lo que habría que mejorar las prácticas de elaboración de este alimento.

12. Perspectivas del proyecto

- Realizar un estudio para conocer la variación de la microbiota bacteriana en diferentes épocas de año, de acuerdo con las diferentes condiciones climáticas.
- Realizar un estudio sobre la cuenta de coliformes con respecto al tiempo, para encontrar el tiempo óptimo de maduración.
- Recomendar a los productores ampliar el tiempo de maduración para asegurar la eliminación de las enterobacterias.
- Realizar un análisis de secuenciación masiva dirigida, utilizando la región V3-V4 del ADNr o algún gen marcador de copia única.
- Determinar la presencia de factores de virulencia en las especies identificadas como *S. parasuis*, *S. infantarius* y *Serratia marcescens*. Así como el potencial probiótico de las especies *L. plantarum* y *E. faecium* identificadas en el Queso Bola de Ocosingo.

13. Literatura citada.

- Adékambi T., Drancourt, M., & Raoult, D. (2009). The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in microbiology*, 17(1), 37-45.
- Agnelli A., Ascher J., Corti G., Teresa M., Nannipieri P. & Pietramellara G. (2004). Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 859-868
- Agudelo-López M., Cesín-Vargas A., Espinoza-Ortega A. & Ramírez-Valverde B. (2019). Evaluación y análisis sensorial del Queso Bola de Ocosingo (México) desde la perspectiva del consumidor. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 10(1), 104-119
- Al-Dhaheri, A. S., Al-Hemeiri, R., Kizhakkayil, J., Al-Nabulsi, A., Abushelaibi, A., Shah, N. P., & Ayyash, M. (2017). Health-promoting benefits of low-fat akawi cheese made by exopolysaccharide-producing probiotic *Lactobacillus plantarum* isolated from camel milk. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 7771-7779
- Aldrete-Tapia, A., Escobar-Ramírez, M. C., Tamplin, M. L., & Hernández-Iturriaga, M. (2014). High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiology*, 44, 136-141.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Arai, S., Kim, H., Watanabe, T., Tohya, M., Suzuki, E., Ishida-Kuroki, K. & Sekizaki, T. (2018). Assessment of pig saliva as a *Streptococcus suis* reservoir and potential source of infection on farms by use of a novel quantitative polymerase chain reaction assay. *American journal of veterinary research*, 79(9), 941-948.
- Badui Dergal, S. (2016). *Química de los alimentos*. México, Pearson Educación.
- Bao Q., Liu W., Yu J., Wang W., Qing M., Chen X. & Zhang H. (2012). Isolation and identification of cultivable lactic acid bacteria in traditional yak milk products of Gansu Province in China. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58(2), 95–105. <http://doi.org/10.2323/jgam.58.95>
- Beresford T. & Williams A. (2004). The microbiology of cheese ripening. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 1, 287-318.
- Beresford T., Fitzsimons N., Brennan N. & Cogan T. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 259-274.
- Bockelmann W. (2010). Secondary cheese starter cultures. *Technology of Cheesemaking*, 193.
- Bosco, F., Cirrincione, S., Carletto, R., Marmo, L., Chiesa, F., Mazzoli, R., & Pessione, E. (2021). PHA Production from Cheese Whey and Scotta”: Comparison between a Consortium and a Pure Culture of *Leuconostoc mesenteroides*. *Microorganisms* 2021, 9, 2426.
- Bravo-Mendoza A. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas de queso Cotija. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM

- Brito C. (2009). Fundamentos Bioquímicos y Microbiológicos del Procesamiento de Quesos. Parte II. Maduración de Queso. Magister en Ciencias y Tecnología de la leche. Universidad Austral de Chile. Instituto de Ciencias y Tecnología de los Alimentos. Valdivia.
- Camacho M.A. (2019) Caracterización química y microbiológica de quesos Bola de Ocosingo. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Caro I., Soto S., Fuentes L., Gutiérrez-Méndez N., García-Islas B., Monroy-Gayosso K. & Mateo J. (2014). Compositional, functional, and sensory characteristics of selected Mexican cheeses. *Food and Nutrition Sciences*, 2014.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmstrom, 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.
- Casillas-Hernández J. (2013). Caracterización molecular de la microbiota bacteriana del queso Cotija elaborado en diversas regiones de México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Castellanos-Rozo, J., Pérez Pulido, R., Grande, M. J., Lucas, R., & Gálvez, A. (2021). *Potentially pathogenic bacteria isolated from Paipa cheese and its susceptibility profiles to antibiotics and biocides. Brazilian Journal of Microbiology*, 52(3), 1535–1543.
- Centeno-Rodríguez M., Gutiérrez-Cárdenas M., Jaime-Patlán M., Meza-Plaza E., Montecillos-Ramírez K., Rojas-Salinas W., & Ozuna C. (2020). Genuine Mexican cheeses: technological processes and manufacturing parameters. *Agroproductividad*, 13(11).
- Cervantes F., Villegas A., Cesín A., & Espinosa A. (2006). Los quesos mexicanos genuinos: un saber hacer que se debe rescatar y preservar. III Congreso Internacional de La Red SIAL Alimentación Y Territorios.
- Cesín-Vargas A. (2014). La leche y los quesos artesanales en México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 11(2), 243-248.
- Chávez-Martínez, A., Paredes-Montoya, P., Rentería-Monterrubio, A. L., Corral-Luna, A., Lechuga-Valles, R., Domínguez-Viveros, J. & Santellano-Estrada, E. (2019). Microbial quality and prevalence of foodborne pathogens of cheeses commercialized at different retail points in Mexico. *Food Science and Technology*, 39, 703-710.
- Chen H. C., Wang S. Y., & Chen M. J. (2008). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, 25(3), 492-501.
- Choi K. H., Lee H., Lee S., Kim S., & Yoon Y. (2016). Cheese microbial risk assessments—A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(3), 307.
- Chombo-Morales P., Kirchmayr M., Gschaedler A., Lugo-Cervantes E., & Villanueva-Rodríguez S. (2016). Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 1153-1161.

- Cocolin L., Innocente N., Biasutti M., & Comi G. (2004). The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), 83-91.
- 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.
- De la Rosa A.M.A. (2013). Dinámica poblacional de la microbiota del queso de poro de balancán durante su proceso de fabricación artesanal. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- De Vuyst, L., & Tsakalidou, E. (2008). *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *International Dairy Journal*, 18(5), 476-485.
- 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.
- Diaz-Ruiz, G., Guyot, J. P., Ruiz-Terán, F., Morlon-Guyot, J., & Wachter, C. (2003). Amylolytic lactic acid bacteria from pozol: a natural potential to produce complementary foods. In *2nd International Workshop. Food-based Approaches for a Healthy Nutrition, Ouagadougou, Burkina Faso* (pp. 411-417).
-
- Dimitrellou, D., Salamoura, C., Kontogianni, A., Katsipi, D., Kandyli, P., Zakynthinos, G., & Varzakas, T. (2019). Effect of milk type on the microbiological, physicochemical and sensory characteristics of probiotic fermented milk. *Microorganisms*, 7(9), 274.
- Dolci P., Alessandria V., Rantsiou K., Bertolino M., & Cocolin L. (2010). Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1-2), 71-75.
- Domínguez-Ramírez, L. L., Rodríguez-Sanoja, R., Tecante, A., García-Garibay, M., Sainz, T., & Wachter, C. (2020). Tolerance to acid and alkali by *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* strain 25124 isolated from fermented nixtamal dough: pozol. studies in APT broth. *Food Microbiology*, 90, 103458.
- Duarte S; Cássio F; Pascoal C. (2012). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology –Insights from Freshwaters. *InTech Europe 2012*: 173-196.
- El Soda, M. (2014). Production of low fat cheddar cheese made using exopolysaccharide-producing cultures and selected ripening cultures. *Advances in Microbiology*, 4(14), 986.
- Ercolini D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 297-314.

- Escobar R., Hernández I. y Gaspar S. (2012). Composición fisicoquímica y microbiológica del Queso Bola de Ocosingo, Chiapas. En Memorias XXXVI Congreso Nacional de Buiatría
- Escobar-Zepeda, A., Godoy-Lozano, E. E., Raggi, L., Segovia, L., Merino, E., Gutiérrez-Rios, R. M., & Sanchez-Flores, A. (2018). Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: defining standards for progressive metagenomics. *Scientific Reports*, 8(1), 1-13.
- Falardeau J., Keeney K., Trmčić A., Kitts D. & Wang S. (2019). Farm-to-fork profiling of bacterial communities associated with an artisan cheese production facility. *Food Microbiology*, 83, 48-58.
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist*, 125(1), 1-15.
- Flórez A. & Mayo B. (2006). PCR–DGGE as a tool for characterizing dominant microbial populations in the Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal*, 16(10), 1205-1210.
- Fox G., Guinee T., Cogan T., McSweeney P. (2010). Fundamentals of cheese science. Aspen Publishers. Maryland. 121-183
- Fox P., McSweeney P., Cogan T. & Guinee T. (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects*. Elsevier.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cologna, N., Cavazza, A., & Poznanski, E. (2011). Microbial analysis of raw cows' milk used for cheese-making: influence of storage treatments on microbial composition and other technological traits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 171-180.
- Friman, M. J., Eklund, M. H., Pitkälä, A. H., Rajala-Schultz, P. J., & Rantala, M. H. J. (2019). Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 61(1), 1-11.
- Gafan, G. P., & Spratt, D. A. (2005). Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion (DGGE)–an attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. *FEMS Microbiology Letters*, 253(2), 303-307.
- Gallegos P, A. B. (2015). *Efectos del pretratamiento de termosonicación en la elaboración y maduración de queso chihuahua* (Master's thesis).
- Gänzle, M. G., & Zheng, J. (2019). Lifestyles of sourdough lactobacilli–Do they matter for microbial ecology and bread quality? *International Journal of Food Microbiology*, 302, 15-23.
- García A. (2018). Caracterización de la agroindustria artesanal y atributos de la valoración en consumidores de queso Bola de Ocosingo, Chiapas. *Revista CIFE: Lecturas de Economía Social*, 20(33), 137-155.
- Giannino, M. L., Marzotto, M., Dellaglio, F., & Feligini, M. (2009). Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3), 188-195.

- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 215-222.
- Gobbetti M., De Angelis M., Di Cagno R., & Rizzello C. (2007). The relative contributions of starter cultures and non-starter bacteria to the flavour of cheese. In *Improving the flavour of cheese* (pp. 121-156). Woodhead Publishing.
- Gobbetti M., Di Cagno R., Calasso M., Neviani E., Fox P., & De Angelis M. (2018). Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 244-254.
- Greppi A., Ferrocino I., La Storia A., Rantsiou K., Ercolini D., & Cocolin L. (2015). Monitoring of the microbiota of fermented sausages by culture independent rRNA-based approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 67-75.
- Hernández-Morales, C., Hernández-Montes, A., Aguirre-Mandujano, E. & De Gante, A (2010). Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterisation of Mexican Añejo cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63(4), 552-560.
- Hernández-Saldaña, O. F., Valencia-Posadas, M., de la Fuente-Salcido, N. M., Bideshi, D. K., & Barboza-Corona, J. E. (2016). Bacteriocinogenic bacteria isolated from raw goat milk and goat cheese produced in the Center of México. *Indian Journal of Microbiology*, 56(3), 301-308.
- Hoshino Y. (2011). *Molecular Analyses of Soil Fungal Community –Methods and Applications*. National Institute for Agro-Environment Sciences
- Hutkins R (2019) *Microbiology and technology of fermented foods*, 2nd edn. Wiley, New York
- Iacumin, L., Cecchini, F., Vendrame, M., & Comi, G. (2020). Emulsion pcr (Epcr) as a tool to improve the power of dgge analysis for microbial population studies. *Microorganisms*, 8(8), 1099.
- INEGI (2005). *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Ocoingo, Chiapas, Clave geoestadística 07059*
- Jabbari V, Khiabani MS, Mokarram RR, Hassanzadeh AM, Ahmadi E, Gharenaghadeh S, Karimi N, Kafil HS. (2017). *Lactobacillus plantarum* as a Probiotic Potential from Kouzeh Cheese (Traditional Iranian Cheese) and Its Antimicrobial Activity. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 9(2):189-193.
- Jans, C., Gerber, A., Bugnard, J., Njage, P. M. K., 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.
- Jans, C., Kaindi, D. W. M., Böck, D., Njage, P. M. K., Kouamé-Sina, S. M., Bonfoh, B., ... & Meile, L. (2013). Prevalence and comparison of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* in raw and fermented dairy products from East and West Africa. *International journal of Food Microbiology*, 167(2), 186-195.
- Jans, C., Meile, L., Kaindi, D. W. M., Kogi-Makau, W., Lamuka, P., Renault, P., ... & Bonfoh, B. (2017). African fermented dairy products—overview of predominant technologically important microorganisms focusing on African *Streptococcus*

infantarius variants and potential future applications for enhanced food safety and security. *International Journal of Food Microbiology*, 250, 27-36.

- Janse I., Bok J., Zwart G. (2004). A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. 57: 279-281.
- Johnson, M. K. (1998). Iron—sulfur proteins: new roles for old clusters. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2(2), 173-181.
- Karabey B, Eroglu D, Vural C, Ozdemir G, Yerlikaya O, Kinik O. (2008). Determination of the microbial flora in traditional İzmir Tulum cheeses by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Journal of Food Science and Technology*. 2018 Mar;55(3):956-963. doi: 10.1007/s13197-017-3003-z.
- Khaled, R., Amer, A. A., & El-Ansary, M. (2018). Microbial Criteria for Evaluation of Locally Manufactured Mozzarella Cheese. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, 59(2).
- Kongo J. (2013). Lactic acid bacteria as starter-cultures for cheese processing: past, present and future developments. In *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. IntechOpen.
- Kousta M., Mataragas M., Skandamis P., & Drosinos E. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, 21(6), 805-815.
- Leclercq-Perlat M. N., Saint-Eve A., Le Jan E., Raynaud S., Morge S., Lefrileux Y., & Picque D. (2019). Physicochemical and sensory evolutions of the lactic goat cheese Picodon in relation to temperature and relative humidity used throughout ripening. *Journal of Dairy Science*, 102(6), 5713-5725.
- Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., & Wang, Q. (2012). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chemistry*, 135(3), 1914-1919.
- Licitra, G., Ogier, J. C., Parayre, S., Pediliggieri, C., Carnemolla, T. M., Falentin, H., ... & Lortal, S. (2007). Variability of bacterial biofilms of the “tina” wood vats used in the Ragusano cheese-making process. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6980-6987.
- Linares A.N. (2022) Identificación molecular de la comunidad bacteriana del queso bola de Ocosingo mediante PCR-DGGE. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Liu G, Nie R, Liu Y, Li X, Duan J, Hao X, Shan Y, Zhang J. (2022). *Bacillus subtilis* BS-15 Effectively Improves Plantaricin Production and the Regulatory Biosynthesis in *Lactiplantibacillus plantarum* RX-8. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2021.772546. PMID: 35154024; PMCID: PMC8837263.
- López A. (2013). Caracterización socio-técnica del Queso Bola de Ocosingo, Chiapas. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México
- López M. (2014). Los Quesos Mexicanos Genuinos. Patrimonio Cultural que debe Rescatarse. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*, (26), 135-142.

- Ma, P., Luo, T., Ge, L., Chen, Z., Wang, X., Zhao, R., & Bao, L. (2021). Compensatory effects of *M. tuberculosis* rpoB mutations outside the rifampicin resistance-determining region. *Emerging Microbes & Infections*, *10*(1), 743-752.
- Marker, M. C. U. R. P. (2021). The Future Journal of Biology. *Future*, *2*, 13-18.
- Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2018). Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality. *Journal of Dairy Science*, *101*(1), 861-870.
- Martino, M. E., Bayjanov, J. R., Caffrey, B. E., Wels, M., Joncour, P., Hughes, S., & Leulier, F. (2016). Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. *Environmental Microbiology*, *18*(12), 4974-4989.
- Medeiros, R. S., Araújo, L. M., Queiroga Neto, V., Andrade, P. P., Melo, M. A., & Gonçalves, M. M. B. P. (2016). Identification of lactic acid bacteria isolated from artisanal Coalho cheese produced in the Brazilian Northeast. *CyTA-Journal of Food*, *14*(4), 613-620.
- Méndez E. (2022). Composición química proximal y caracterización microbiológica de quesos artesanales de Ocosingo. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Mladenović, K. G., Muruzović, M. Ž., Žugić Petrović, T., Stefanović, O. D., & Čomić, L. R. (2018). Isolation and identification of Enterobacteriaceae from traditional Serbian cheese and their physiological characteristics. *Journal of Food Safety*, *38*(1), e12387.
- Montel M., Buchin S., Mallet A., Delbes-Paus C., Vuitton D., Desmasures N., & Berthier F. (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, *177*, 136-154.
- Moraes P., Vicsosa G., Yamazi A., Ortolani M., & Nero L. (2009). Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*, *6*(2), 245-249.
- 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.
- Muyzer G., de Waal E., Uitterlinden G. (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*(3): 695-700.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O., & Jannasch, H. W. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology*, *164*(3), 165-172.
- Nalepa B., & Markiewicz L. H. (2017). PCR-DGGE markers for qualitative profiling of microbiota in raw milk and ripened cheeses. *LWT*, *84*, 168-174.

- Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269-5273
- Nei, M., & Miller, J. C. (1990). A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics*, 125(4), 873-879.
- Neilson J., Jordan F., Maier R. (2013). Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *Journal of Microbiological Methods* 92(3): 256-263.
- Neri O. (2022). Composición química y características microbiológicas de un queso artesanal chiapaneco: el Bola de Ocosingo. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química
- Nisiotou, A. A., Rantsiou, K., Iliopoulos, V., Cocolin, L., & Nychas, G.-J. E. (2011). Bacterial species associated with sound and Botrytis-infected grapes from a Greek vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 432–436.
- NORMA MEXICANA NMX-F-735-COFOCALEC-2018, SISTEMA PRODUCTO LECHE-ALIMENTO-LÁCTEO-ALIMENTO LÁCTEO REGIONAL-QUESO COTIJA ARTESANAL MADURADO-DENOMINACIÓN, ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA
- NORMA OFICIAL MEXICANA NMX-F-733-COFOCALEC-2013 SISTEMA PRODUCTO LECHE-ALIMENTOS-LÁCTEOS-QUESO OAXACA-DENOMINACIÓN, ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA.
- 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.
- Olivo, P. M., Dos Santos, G. T., Rodrigues, B. M., Osmari, M. P., Marchi, F. E. D., Madrona, G. S., & Pozza, M. S. (2021). Starter bacteria as producers of CLA in ripened cheese. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93.
- Oluk, A. C., Güven, M., & Hayaloglu, A. A. (2014). Proteolysis texture and microstructure of low-fat Tulum cheese affected by exopolysaccharide-producing cultures during ripening. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(2), 435-443.
- Olvera-García, M., Sanchez-Flores, A., & Quirasco Baruch, M. (2018). Genomic and functional characterisation of two Enterococcus strains isolated from Cotija cheese and their potential role in ripening. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(5), 2251-2267.
- Özcan E., Seven M., Şirin B., Çakır T., Nikerel E., Teusink B., & Toksoy Öner E. (2021). Dynamic co-culture metabolic models reveal the fermentation dynamics, metabolic capacities, and interplays of cheese starter cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(1), 223-237.

- Peixoto, R. S., da Costa Coutinho, H. L., Rumjanek, N. G., Macrae, A., & Rosado, A. S. (2002). Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in applied microbiology*, 35(4), 316-320.
- Pogány Simonová, M., Chrastinová, L., & Lauková, A. (2020). Autochthonous strain *Enterococcus faecium* EF2019 (CCM7420), its bacteriocin and their beneficial effects in broiler rabbits—A review. *Animals*, 10(7), 1188.
- PROYECTO DE NORMA MEXICANA PROY-NMX-F-767-COFOCALEC-2019-SISTEMA PRODUCTO LECHE-ALIMENTOS-LÁCTEOS-QUESO DE PORO DE BALANCÁN-DENOMINACIÓN, ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA
- PROYECTO DE NORMA MEXICANA PROY-NMX-F-768-COFOCALEC-2019-SISTEMA PRODUCTO LECHE-ALIMENTOS-LÁCTEOS-QUESO BOLA DE OCOSINGO-DENOMINACIÓN, ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA
- Randazzo C., Caggia C., & Neviani E. (2009). Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, 78(1), 1-9.
- Randazzo, C. L., Pitino, I., De Luca, S., Scifò, G. O., & Caggia, C. (2008). Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 269-278.
- Randazzo, C. L., Vaughan, E. E., & Caggia, C. (2006). Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR–DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1-2), 1-8.
- Rantsiou, K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G., & Cocolin, L. (2005). Culture-dependent and-independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1977-1986.
- Rao, R., & Basak, N. (2021). Optimization and modelling of dark fermentative hydrogen production from cheese whey by *Enterobacter aerogenes* 2822. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(2), 1777-1800.
- 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), 136-145.
- Restaino, L., Frampton, E. W., Lionberg, W. C., & Becker, R. J. (2006). A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients, and environmental sources. *Journal of food protection*, 69(2), 315-322.
- Risjani, Y., & Abidin, G. (2020). Genetic diversity and similarity between green and brown morphotypes of *Kappaphycus alvarezii* using RAPD. *Journal of Applied Phycology*, 32(4), 2253-2260.
- Rocchetti, M. T., Russo, P., Capozzi, V., Drider, D., Spano, G., & Fiocco, D. (2021). Bioprospecting Antimicrobials from *Lactiplantibacillus plantarum*: Key Factors

Underlying Its Probiotic Action. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 12076.

- Roselló-Soto E., Barba-Orellana S., Barba F. J., Quilez F., Roohinejad S., & Koubaa M. (2018). New Trends in Molecular Techniques to Identify Microorganisms in Dairy Products. *Molecular Techniques in Food Biology: Safety, Biotechnology, Authenticity and Traceability*, 309-322.
- Ruvalcaba-Gómez, J. M., Ruiz-Espinosa, H., Arteaga-Garibay, R. I., Rojas-López, M., Amador-Espejo, G. G., Anaya-Esparza, L. M., & Delgado-Macuil, R. J. (2020). Texture, physicochemical and sensory properties of artisanal Adobera cheese from Los Altos de Jalisco, a genuine Mexican cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 73(2), 411-420.
- Ryan, P. M., Burdikova, Z., Beresford, T., Auty, M. A. E., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., & Stanton, C. (2015). Reduced-fat Cheddar and Swiss-type cheeses harboring exopolysaccharide-producing probiotic *Lactobacillus mucosae* DPC 6426. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8531-8544.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Salipante, S. J., & Jerome, K. R. (2020). Digital PCR—an emerging technology with broad applications in microbiology. *Clinical chemistry*, 66(1), 117-123.
- Salminen, S., & Von Wright, A. (2004). Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. CRC Press.
- Sánchez C. (2016). Diversidad y dinámica del microbioma de bacterias lácticas del queso chihuahua. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Schäfer, H., & Muyzer, G. (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods in microbiology*, 30, 425-468.
- Settanni L & Moschetti G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691-697.
- Storelli, G., Strigini, M., Grenier, T., Bozonnet, L., Schwarzer, M., Daniel, C. & Leulier, F. (2018). *Drosophila* perpetuates nutritional mutualism by promoting the fitness of its intestinal symbiont *Lactobacillus plantarum*. *Cell Metabolism*, 27(2), 362-377.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. (2007). MEGA 4, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599. DOI: 10.1093/molbev/msm092.
- 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(3), 512-526.
- Thermofisher 2021, Kit de clonación de productos duplicados mediante PCR CloneJET. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231>
- Thompson J., Marcelino L., Polz M. (2002). Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence, and elimination by 'reconditioning PCR'. *Oxford Journals* 30(9): 2083-2088.

- Tian, Y., He, X., Torralba, M., Yooseph, S., Nelson, K. E., Lux, R., & Shi, W. (2010). Using DGGE profiling to develop a novel culture medium suitable for oral microbial communities. *Molecular oral microbiology*, 25(5), 357-367.
- 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.
- Tsanasidou, C., Asimakoula, S., Sameli, N., Fanitsios, C., Vandera, E., Bosnea, L. & Samelis, J. (2021). Safety evaluation, biogenic amine formation, and enzymatic activity profiles of autochthonous enterocin-producing Greek cheese isolates of the *Enterococcus faecium/durans* group. *Microorganisms*, 9(4), 777.
- Tzora, A., Nelli, A., Voidarou, C., Fthenakis, G., Rozos, G., Theodorides, G. & Skoufos, I. (2021). Microbiota “Fingerprint” of greek feta cheese through ripening. *Applied Sciences*, 11(12), 5631.
- Van Hannen, E. J., Zwart, G., van Agterveld, M. P., Gons, H. J., Ebert, J., & Laanbroek, H. J. (1999). Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 795-801.
- Velázquez-Ordoñez V., Valladares-Carranza B., Tenorio-Borroto E., Talavera-Rojas M., Varela-Guerrero J., Acosta-Dibarrat J. & Pareja L. (2019). Microbial contamination in milk quality and health risk of the consumers of raw milk and dairy products. *Nutrition in Health and disease-our challenges Now and Forthcoming time. Intech Open*. 181
- Villanueva-Carvajal, A., Jiménez-Guzmán, J., García-Garibay, M., & Díaz-Ramírez, M. (2018). Poro de balancán cheese: effect of the elaboration process on the safety, sensorial and functional properties. *Agroproductividad*, 11(11).
- Villegas de Gante A., Cervantes, F., Cesín A., Espinoza A., Hernández A., & Santos A. (2014). Atlas de los quesos mexicanos genuinos. *Biblioteca Básica de Agricultura*.
- Villegas G., Santos M. y Cervantes E., (2016). Los quesos mexicanos tradicionales. 1ª. Edición. Universidad Autónoma Chapingo. 197
- Vos, M., Quince, C., Pijl, A. S., de Hollander, M., & Kowalchuk, G. A. (2012). A comparison of rpoB and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. *PLoS one*, 7(2), e30600.
- Wang, J., Wu, T., Fang, X., & Yang, Z. (2019). Manufacture of low-fat Cheddar cheese by exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* JLK0142 and its functional properties. *Journal of Dairy Science*, 102 (5), 3825-3838.
- Wang, J., Yi, X., Liang, P., Tao, Y., Wang, Y., Jin, D., & Zheng, H. (2021). Investigation of the genomic and pathogenic features of the potentially zoonotic *Streptococcus parasuis*. *Pathogens*, 10(7), 834.
- Wullschleger, S., Lacroix, C., Bonfoh, B., Sissoko-Thiam, A., Hugenschmidt, S., Romanens, E., Baumgartner, S., Traoré, I., Yaffee, M., Jans, C., Meile, L. (2013). Analysis of lactic acid bacteria communities and their seasonal variations in a

- spontaneously fermented dairy product (Malian fènè) by applying a cultivation/genotype-based binary model. *International Dairy Journal*, 29, 28–35.
- Yamada, R., Le, H. T., Arai, S., Tohya, M., Ishida-Kuroki, K., Nomoto, R., & Sekizaki, T. (2018). Development of PCR for identifying *Streptococcus parasuis*, a close relative of *Streptococcus suis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 18-0083.
 - Yu, A. O., Goldman, E. A., Brooks, J. T., Golomb, B. L., Yim, I. S., Gotcheva, V., Marco, M. L. (2021). Strain diversity of plant-associated *Lactiplantibacillus plantarum*. *Microbial Biotechnology*, 14(5), 1990–2008.
 - Zhang, J., Zhang, X., Zhang, L., Zhao, Y., Niu, C., Yang, Z., & Li, S. (2014). Potential probiotic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Inner Mongolia. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(2), 225-235.
 - Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H., Mattarelli, P. & 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*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020 Apr;70(4):2782-2858. doi: 10.1099/ijsem.0.004107. Epub 2020 Apr 15. PMID: 32293557
 - Zisu, B., & Shah, N. P. (2007). Texture characteristics and pizza bake properties of low-fat Mozzarella cheese as influenced by pre-acidification with citric acid and use of encapsulated andropy exopolysaccharide producing cultures. *International Dairy Journal*, 17(8), 985-997.
 - Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Grangette, C., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2008). *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *International Journal of Food Microbiology*, 121(1), 18-26.
 - Zuñiga-Bustos A. (2009). Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por métodos moleculares. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
 - 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.

14. ANEXOS

A. Especies bacterianas encontradas en el Queso Bola de Ocosingo

✚ Género: *Streptococcus*

El género *Streptococcus* se caracteriza por tener morfología de cocos Gram positivos, no esporulados y es habitual encontrarlos encapsulados. Son anaerobios facultativos o estrictos, catalasa negativos, metabolizan habitualmente los azúcares formando gas. Se encuentran, como comensales del hombre y otros animales. En productos fermentados se propaga rápidamente al comienzo del proceso y produce ácido pirúvico, ácido fórmico y dióxido de carbono. Dentro de este género, algunas especies son desarrolladas comercialmente como probióticos, por ejemplo, *Streptococcus thermophilus* (Zupancic, *et al.*, 2017).

Se ha reportado la presencia de *Streptococcus* en leche cruda de camello y productos lácteos fermentados de África (Jans, *et al.*, 2017), en leche fermentada colombiana (Motato, *et al.*, 2017), en quesos artesanales como el Queso Cabrales, Castelmagno, Feta, Fontina, Pecorino Siliciano, entre otros (Flórez & Mayo, 2006; Dolci, *et al.*, 2010; Giannino, *et al.*, 2009; Randazzo, *et al.*, 2008). En el grupo de trabajo se han realizado análisis previos de una muestra de Queso Bola de Ocosingo, donde se identificó como bacteria dominante a *Streptococcus* spp (Linares, 2022). Así mismo, se ha identificado este género en otros Quesos mexicanos como lo es en el Queso Cotija (Chombo-Morales, *et al.*, 2016) y el Queso Poro de Tabasco (Aldrete-Tapia, *et al.*, 2014).

➤ *Streptococcus parasuis*

Se ha observado que *Streptococcus parasuis* tiene diversos serotipos y genotipos, lo que ha planteado dudas sobre su taxonomía y ha llevado a la reclasificación de varios serotipos como especies nuevas. *S. parasuis* es una especie que ha sido

separada taxonómicamente del grupo de *Streptococcus suis* (un patógeno considerado zoonótico) (Yamada, *et al.*, 2018).

Esta especie ha sido identificada en cerdos sanos y en cerdos enfermos, lo que sugiere que *S. parasuis* está involucrado en la microbiota normal de los cerdos y que pudiera ser un patógeno oportunista. Sin embargo, esta información no está clara debido a la falta de métodos de detección apropiados que discriminen *S. parasuis* de *S. suis* (Yamada, *et al.*, 2018). Ambas especies, comparten características similares, sin embargo, difieren en actividad enzimática y producción de ácido (Yamada, *et al.*, 2018). En una evaluación sobre la colonización de *Streptococcus suis* y *Streptococcus parasuis* en granjas porcinas en Japón, se observó que la mayoría de las muestras de saliva de los cerdos analizados, contenían *S. suis*. Este hallazgo indicó que *S. parasuis* tiene una baja capacidad de colonización en cerdos, existe una preferencia de *S. parasuis* por colonizar el ambiente y pueden no estar implicados en las infecciones (Arai, *et al.*, 2018).

En cuanto a los alimentos fermentados mexicanos, ha sido identificado *S. suis* en el Queso Cotija como especie dominante, identificada a partir de DGGE mediante la amplificación del gen *rpoB* (Casillas, 2013).

➤ ***Streptococcus infantarius***

Streptococcus infantarius es una bacteria comúnmente asociada con el trato gastrointestinal de los animales y los seres humanos (Herrera, 2009). Además, se ha aislado a partir de productos lácteos, las heces fecales de mamíferos, sangre humana y pacientes con endocarditis (Jans *et al.*, 2012; Wullschleger, *et al.*, 2013). También se ha encontrado en los alimentos de leche de camella fermentada de manera natural, como el garris de Sudán, suosac en Kenia y Somalia. Además, en otros alimentos fermentados de África (Jans, *et al.*, 2013), así como en el queso tradicional de Tulum de İzmir, Turquía y el Queso Coalho artesanal producido en el nordeste brasileño, ha sido identificada *S. infantarius* como especie dominante (Karabey, *et al.*, 2018; Medeiros, *et al.*, 2016).

En alimentos fermentados mexicanos, se ha logrado identificar también en el Queso Cotija como una especie dominante (Casillas, 2013). Además, en el pozol, bebida indígena de origen mexicano preparada a partir de masa de maíz nixtamalizada y fermentada, predominan las bacterias del género *Streptococcus*. Análisis microbiológicos indican que el pozol se caracteriza por tener una gran cantidad de bacterias ácido lácticas, naturalmente este tipo de microorganismos son los primeros en desarrollarse y están presentes durante todo el proceso de elaboración de la bebida. Principalmente se desarrollan bacterias amilolíticas como *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (Díaz, *et al.*, 2003). El desarrollo de estas bacterias transforma el almidón del nixtamal, primero en glucosa y maltosa y posteriormente en ácidos (Domínguez-Ramírez, *et al.*, 2020).

Al igual que *S. parasuis*, *S. infantarius* se ha evidenciado que algunas cepas están relacionadas con la incidencia de algunas enfermedades (Jans, *et al.*, 2013). Sin embargo, existe poca información con respecto a la presencia de factores de virulencia en los cultivos de distintos aislados, por ejemplo, en el pozol (bebida fermentada) y sobre todo de su potencial de patogenicidad. Se ha observado que en un alto porcentaje de las cepas (93.5%) no se presentaron los factores de virulencia buscados; sin embargo, en promedio 90% de las cepas presentaron adherencia a diferentes células epiteliales y debido a que esta capacidad de adherencia no está relacionada con la presencia de factores de virulencia, podría estar relacionada con la capacidad probiótica, que también se ha estudiado en *S. infantarius* (De Vuyst & Tsakalidou, 2008; Zoumpopoulou, *et al.*, 2008). De esta manera, es factible considerar que algunas cepas obtenidas de estos microorganismos aisladas de productos fermentados tienen propiedades probióticas y beneficiosas.

Género: *Enterococcus*

Los enterococos se caracterizan por presentar una morfología de cocos Gram-positivos, que pueden encontrarse solos, en pares o cadenas cortas, son anaerobios facultativos y pueden crecer en medio sólido expuesto al aire, son no

esporulados, generalmente no móviles, catalasa, reductasa y oxidasa negativos, (Salminen, 2004). El género *Enterococcus* forma parte del grupo de las BAL, las cuales se caracterizan por producir ácido láctico, como componente mayoritario de la fermentación de carbohidratos (Giraffa, 2003).

Los *Enterococcus* se caracterizan por colonizar alimentos fermentados tradicionales. Producen ciertos compuestos con actividad antibacteriana, principalmente activos contra *Listeria monocytogenes*. Dentro de este género, hay especies que son considerados como uno de los principales Gram-positivo causante de infecciones intrahospitalarias, debido a su asociación con brotes de infecciones nosocomiales. Se han realizado estudios que buscan generar información que permitan diferenciar cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* de cepas nosocomiales, comparadas con cepas aisladas de quesos madurados como el Queso Cotija. Se ha observado que las cepas de enterococos aisladas del queso Cotija no pertenecen a los Complejos Clonales de alta virulencia. Se evidenció las discrepancias entre cepas nosocomiales y las presentes en otros nichos ecológicos, principalmente en alimentos. Además, se ha observado que las cepas adaptadas a un alimento contienen genes que codifican para enzimas relacionadas con el sistema proteolítico, un sistema de inmunidad bacteriano (CRISPR-cas) y enterocinas. Además, se han realizado descripciones del potencial de patogenicidad de ambas cepas, concluyendo que las cepas de alimentos carecen de las islas de patogenicidad que previamente han sido reportadas en cepas nosocomiales (Olvera, 2018).

➤ ***Enterococcus faecium***

E. faecium ha sido identificado en el estudio para determinar los miembros de la microbiota de Quesos tradicionales de Tulum de İzmir, Turquía, en Quesos tradicionales griegos elaborados a partir de leche cruda, Graviera y Galotyri, así como en el Queso feta, Fontina, Ragusano (Karabey, *et al.*, 2018; Tsanasidou, *et al.*, 2021; Tzora, 2021, Giannino, *et al.*, 2009; Licitra, *et al.*, 2007). Además, ha sido

identificado en otros alimentos, principalmente en salchichas fermentadas (Rantsiou, *et al.*, 2005).

En alimentos fermentados mexicanos se ha encontrado la presencia de *Enterococcus faecium*, de los cuales se han detectado genes codificantes de actividades lipolíticas (lipasas y esterases), así como enzimas relacionadas a la producción de metabolitos que contribuyen a la formación de aromas y sabores característicos del Queso Cotija. Además, se han identificado genes codificantes para bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas, compuestos que pueden tener actividad antimicrobiana (Olvera-García, *et al.*, 2018).

Por otra parte, *E. faecium* aisladas del Queso Bola de Ocosingo y también del queso Cotija; es una especie que se caracteriza por la resistencia a antibióticos intrínseca del género, las cepas de *Enterococos* presentes en el queso Cotija se caracterizan por presentar regiones genómicas comúnmente ausentes en los aislados nosocomiales. Dichas regiones, contienen genes que codifican para bacteriocinas y algunos genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos. Sin embargo, la principal diferencia está en la ausencia de factores de virulencia que puedan dañar al hospedero y resistencia reducida a antibióticos. Se ha determinado que esta especie es clave en el proceso de maduración de los quesos, debido a sus actividades de proteólisis, lipólisis y ruptura del citrato, que son indispensables para el desarrollo de aromas y sabores (Pogány, *et al.*, 2020). Así mismo ocurre con *L. plantarum*, especie que se caracteriza por presentar una actividad inhibidora contra algunas bacterias patógenas, además tiene importancia comercial como cultivo iniciador para múltiples fermentaciones de alimentos y se aplica como cultivo probiótico (Rocchetti, *et al.*, 2021)

Género: *Serratia*

El género *Serratia* se caracteriza por tener morfología de bacilo, Gram-negativas, se clasificaron en la nueva familia del orden Enterobacterales: Yersiniaceae, *Serratia* spp. también se han detectado en el 1.3 al 2% de las muestras de leche de

tanque a granel, pueden formar biopelículas en superficies inanimadas y producir enzimas resistentes al calor, por lo que son capaces de causar deterioro en diferentes puntos del procesamiento de la leche (Friman, *et al.*, 2019).

➤ ***Serratia marcescens***

Son bacterias ambientales ubicuas capaces de causar infecciones oportunistas en humanos y muchas especies animales, incluida la mastitis en vacas lecheras. Estos organismos se han aislado del agua, el suelo, diferentes tipos de plantas e insectos, el entorno de la granja, sala de ordeño y de las heces de las vacas lecheras. También se ha identificado de una gran variedad de alimentos: harinas de maíz, trigo y arroz, cereales; y fuentes ambientales. (Restaino, *et al.*, 2006).

🚩 **Género: *Citrobacter***

Citrobacter sp. representa uno de los géneros de coliformes ubicuos más frecuentemente aislados. Son bacilos Gram negativos aerobios que se encuentran frecuentemente en el agua, el suelo, la comida, vegetación y en el tracto intestinal de muchos animales además del hombre. Algunos pueden crecer en la leche a temperaturas de refrigeración y pueden causar bacteriemia en personas inmunodeprimidas (Castellanos-Rozo, *et al.*, 2021).

➤ ***Citrobacter freundii***

C. freundii se ha identificado en el estudio de los coliformes como la especie más frecuente, están presentes en el Queso Paipa, Quesos Mozzarella, Queso Pecorino Siciliano (Castellanos-Rozo, *et al.*, 2021; Khaled, *et al.*, 2018; Todaro, 2011). En otros alimentos también ha sido identificado como en la microbiota bacteriana de la uva para vino, la mayoría de los aislamientos pertenecían a diferentes especies de Enterobacteriaceae. Así como, en el suero de leche donde ha sido frecuentemente identificada (Bosco, *et al.*, 2021).

✚ **Género: *Lactiplantibacillus***

Las especies de *Lactiplantibacillus* son bacilos Gram positivos, no formadores de esporas, homofermentadores e inmóviles. Fermentan una amplia gama de carbohidratos; la mayoría de las especies metabolizan los ácidos fenólicos por actividades de esterasa, descarboxilasa y reductasa (Zheng, *et al.*, 2020). La formación de quórum (QS) es una forma de comunicación muy común dentro de este grupo de bacterias, han demostrado tener un efecto bacteriostático contra *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Liu, *et al.*, 2022).

Las especies de *Lactiplantibacillus* se aíslan de muchos alimentos fermentados diferentes, incluidos vegetales fermentados, carnes, productos lácteos y cereales (Martino, *et al.*, 2016). Además, se encuentran en hábitats asociados con insectos o como residentes temporales de la microbiota intestinal de vertebrados y se caracterizan por un comportamiento nómada. (Gänzle & Zheng, 2019; Hutkins, 2019).

➤ ***Lactiplantibacillus plantarum* (anteriormente, *Lactobacillus plantarum* Zheng, *et al.*, 2020).**

Lactiplantibacillus plantarum es uno de los probióticos comunes en los alimentos fermentados. *L. plantarum* se ha utilizado ampliamente como especie modelo para estudios metabólicos, ecológicos y genéticos en lactobacilos. Tiene importancia comercial como cultivo iniciador para múltiples fermentaciones de alimentos y se aplica como cultivo probiótico. Así mismo, contribuye al deterioro de la cerveza y el vino. También forma parte de la microbiota de los insectos y se aísla del tracto intestinal humano, particularmente de la cavidad oral (Storelli, *et al.*, 2018).

L. plantarum han sido aislados de diferentes tipos de alimentos fermentados como la col fermentada china tradicional y el kéfir tibetano, donde han sido evaluados por sus propiedades probióticas, así como su viabilidad después de la producción y el

almacenamiento (Li, *et al.*, 2012; Zhang, *et al.*, 2014; Wang, *et al.*, 2019). Incluyendo también el Queso Cheddar, Mozzarella, Tulum y Harawi (Zisu & Shah, 2007; Oluk, *et al.*, 2014; Soda, 2014; Ryan, *et al.*, 2015; Al-Dhaheeri, *et al.*, 2017).

Género: *Enterobacter*

Un género representativo de coliformes ubicuos es el género *Enterobacter*, se caracteriza por tener morfología de bacilo, Gram negativos. Son microorganismos anaerobios facultativos y saprófitos que se encuentran en el suelo, las aguas residuales y como microbiota entérica comensal del tracto gastrointestinal humano (Trmčić, *et al.*, 2016).

Se ha asociado con infecciones nosocomiales en humanos, causando bacteriemia, endocarditis, artritis séptica, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio inferior, del tracto urinario e intraabdominales. Algunas *Enterobacter* también han sido reportadas patógenos de plantas. Sin embargo, este género también incluye varias especies que han sido encontradas frecuentemente en la leche y el queso. Aunque *Enterobacter* normalmente se aísla de la leche cruda y pasteurizada, no se considera una potente bacteria que pueda afectar sensorialmente a los lácteos. Diferentes especies pertenecientes a este género se han aislado como parte de la microbiota presente en leche cruda fría (Rao & Basak, 2021), también en la leche entera para la elaboración de Queso Grana Trentino y en diferentes tipos de queso (Franciosi, *et al.*, 2011).

En cuanto a los coliformes encontrados en los diferentes quesos, se han identificado como especies patógenas. Sin embargo, la mayoría de los coliformes son inofensivos y viven en los intestinos de humanos y animales. Estos realizan importantes transformaciones bioquímicas en los quesos que influyen significativamente en sus características sensoriales (Trmčić, *et al.*, 2016). Entre las especies de coliformes, *Serratia marcescens* se colocó como una de las especies dominantes. Son bacterias ambientales capaces de causar infecciones oportunistas en humanos y muchas especies animales, incluida la mastitis en vacas lecheras.

Sin embargo, ciertas cepas también pueden ser beneficiosas al contribuir a la maduración de quesos elaborados con leche cruda, debido a su actividad proteolítica. Lo que sugiere que no todos los biotipos de especies contaminantes de la leche pueden realizar esta actividad asociada al deterioro (Hernández-Saldaña, *et al.*, 2016)

Así mismo, *Citrobacter freundii* ha sido identificada en distintas matrices de alimentos, como es el caso de los mostos en fermentación, esas poblaciones de coliformes disminuyeron mientras proliferaban otras especies, como *Lactiplantibacillus plantarum* (especie identificada en este estudio para los quesos Bola de Ocosingo) y *Enterobacter ludwigii*. (Nisiotou, *et al.*, 2011). Este último género, es representativo de coliformes y se han asociado con infecciones nosocomiales en humanos. Sin embargo, también incluye varias especies que se pueden encontrar en la leche y el queso. Aunque *Enterobacter* normalmente se aísla de la leche cruda y pasteurizada, no se considera una potente bacteria que pueda afectar sensorialmente a los lácteos. (Martin, *et al.*, 2018).

B. Recuperación del paquete celular a partir de los quesos

- I. Pesar en la campana de flujo laminar 15g de cada una de las muestras dentro de las bolsas para Stomacher (Seward).
- II. Adicionar 50 mL de citrato de sodio al 2%, pH8.
- III. Homogeneizar durante 2 min/300rpm dentro del Stomacher, para llevar a cabo una ruptura mecánica de la matriz del queso.
- IV. 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.
- V. Mezclar a alta velocidad dentro el Stomacher durante 1 min.
- VI. Incubar durante 1 h/100 rpm/ 45°C.
- VII. Posteriormente dividir la mezcla en 2 tubos estériles para centrifuga de 50 mL (Falcon).
- VIII. Centrifugar a 3500 rpm/7 min/ 4°C para lograr separar las fracciones de proteína y grasa de las células de los microorganismos presentes en el queso.
- IX. 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.
- X. Centrifugar a 8500 rpm/5min/4°C.
- XI. Desechar el sobrenadante y lavar el pellet 3 veces con solución salina 0.85% pH7, centrifugar en cada ocasión 8500 rpm/5min/4°C.
- XII. Resuspender el pellet en 1 mL de solución salina 0.85% pH7, transferir a un tubo de 2 mL (eppendorf)
- XIII. Centrifugar a 14000 rpm/10 min/4°C, se eliminó el sobrenadante.

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

C. Extracción de ADN (Kit Mericon FOOD)

Protocolo para 200mg

- I. En un tubo de 2 mL, añadir 2.5 μ L de proteinasa K (10mg/mL), 1 mL de buffer de lisis y 10 μ L de lisozima (10mg/mL), agitar vigorosamente.
- II. Adicionar la mezcla al pellet, agitar vigorosamente.
- III. Incubar a 60 °C/ 600 rpm/ 1 h
- IV. Centrifugar a 2800rpm/5min
- V. Dentro de la campana añadir cloroformo en relación 1:1 (aproximadamente 500 μ L) a un tubo de 2mL nuevo y transferir por decantación el sobrenadante.
- VI. Vórtex por 15 s y centrifugar a 12000 rpm/20 min/ 4°C.
- VII. Con ayuda de una micropipeta transferir 500 μ L de la fase superior a un tubo de 2 mL, añadir buffer de unión en relación 1:1 (500 μ L). Mezclar en vórtex
- VIII. Transferir a una columna Spin QIAquick en un tubo de 2 mL, centrifugar a 14000 rpm /1 minuto.
- IX. Lavar la columna con 800 μ L de buffer de lavado, centrifugar a 5000 rpm/ 5 min en dos ocasiones. Desechar columna.
- X. Añadir 500 μ L de Buffer de lavado AW2, centrifugar a 10000 rpm/ 1 min.
- XI. Secar la columna centrifugando en las mismas condiciones, desechar el tubo y colocar la columna sobre un tubo de 1.5 mL.
- XII. Transferir la columna a un tubo de 1.5 mL y adicionar 50 μ L de buffer EB (1X TE) previamente calentado a 65 °C/ 10 minutos.
- XIII. Incubar unos minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 10000 rpm/ 2 min, desechar la columna y conservar a -20 °C hasta su utilización.

D. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante DGGE

Tabla C1. Porcentaje de acrilamida y tamaño de productos para gel DGGE.

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

Tablas C2. Reactivos para DGGE.

Soluciones desnaturalizantes para gradiente de la región V3 del DNAr 16S

Reactivo	30%	60%
Acrilamida/Bis 40% (mL)	4.5	4.5
TAE 50X (µL)	360	360
Formamida (mL)	2.16	4.32
Urea (g)	2.27	4.54
Agua desionizada	----	----
Volumen total	18 mL	18 mL
PSA (µL)	160	160
TEMED (µL)	16	16

Soluciones desnaturalizantes para gradiente del gen *rpoB*

Reactivo	30%	50%
Acrilamida/Bis 40% (mL)	4.5	4.5
TAE 50X (µL)	360	360
Formamida (mL)	2.16	3.60
Urea (g)	2.27	3.78
Agua desionizada	----	----
Volumen total	18 mL	18 mL
PSA (µL)	160	160
TEMED (µL)	16	16

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	

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

- I. Una vez desmontado el gel del equipo, sumergirlo en la solución de tinción 1 durante 20 minutos en agitación.
- II. Enjuagar con agua destilada por 1 minuto.
- III. Sumergir en la solución reveladora 2 de 5 a 10 minutos o hasta la aparición de bandas, mantener en agitación. Previamente llevar la solución a una temperatura de 55°C.
- IV. Sumergir en la solución de paro 3 durante 1 minuto.
- V. Enjuagar con agua destilada.

Solución	Reactivo (Vol total 250ml)	Procedimiento	Tiempo
1. Tinción	Etanol 10% - 25 mL Ác. Acético 0.5% - 1.25 mL AgNO ₃ 0.1N 0.2% - 29.41 mL H ₂ O desionizada 194.34 mL	Sumergir gel en solución teñidora y agitar. Lavar con agua destilada	20 min
2. Reveladora	NaOH 3% - 7.5g Formaldehído 37% 0.1% - 0.675 mL H ₂ O desionizada 249.325 mL	Sumergir gel en solución reveladora previamente calentada a 55°C y agitar.	10 min (o hasta la aparición de bandas e intensidad deseada)
3. Paro	Etanol 10% - 25 mL Ác. Acético 0.5% - 1.25 mL H ₂ O desionizada 223.75 mL	Sumergir gel en la solución de paro	1 min

F. Clonación CloneJET PCR Cloning Kit

- I. Hacer el cálculo para conocer la cantidad necesaria de producto de PCR purificado en una relación inserto-vector 3:1

$$\frac{(\text{ng Vector})(\text{tamaño Inserto})}{\text{tamaño del Vector}} \left(\text{relacion } \frac{\text{Inserto}}{\text{Vector}} \right) = \text{ng Inserto}$$

- II. Preparar la reacción de ligación en hielo

REACTIVO	VOLUMEN
Agua grado Biología Molecular	7 µL
Buffer R 2X	10 µL
Vector de Clonación pJET (50ng/µL)	1 µL
Producto PCR purificado	1 µL
T4 DNA Ligasa	1 µL
Volumen total	20 µL

- III. Agitar brevemente en vórtex y centrifugar unos segundos
- IV. Incubar la mezcla de ligación por 5 min a temperatura ambiente, para productos de PCR mayores a 3 kb prolongar hasta 30 min.

Transformación

- I. Descongelar en hielo las células competente 10B Mix & Go (Zymo Research) y repartir en tubos 50 µL de células.
- II. Agregar 2.5 µL de la mezcla de ligación y agitar suavemente.
- III. Incubar en hielo durante 5 min, máximo 60 min.
- IV. Plaquear todo el volumen en cajas Petri con agar LB más ampicilina con varilla de vidrio.
- V. Incubar a 37°C toda la noche.
- VI. Digestión:

Reactivo	Volumen
Agua libre de nucleasas	10.5
Buffer R 10X	2 µL
ADN (plásmido)	2.5 µL
Enzima XhoI	5 µL
Volumen total	20 µL

G. Riqueza específica, intensidad relativa promedio y dominancia relativa del gen *rpoB*

BANDAS	Quesos Ocosingo	Laltic	La Maya	Queshill	Dorados de la Selva	La Regional	Santa Rosa	La Peña
1	0.017431	-----	-----	0.05326	-----	-----	-----	-----
2	0.009361	-----	-----	0.009361	-----	-----	-----	-----
3	-----	-----	0.048741	-----	-----	-----	-----	-----
4	0.011943	0.215623	0.021304	-----	-----	-----	-----	-----
5	0.00807	0.101356	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6	0.508715	1	-----	-----	1	0.06133	0.672369	-----
7	0.073596	0.236927	0.135249	0.102647	0.287605	0.109748	0.261459	0.053583
8	0.154939	-----	0.131375	0.106843	-----	0.105229	-----	-----
9	1	0.698838	1	1	0.095223	1	0.023241	0.045836
10	-----	-----	0.439638	-----	0.265655	-----	-----	-----
11	-----	-----	0.252421	-----	0.166882	-----	-----	-----
12	0.180762	0.143641	0.358941	0.104906	0.098128	0.323757	-----	-----
13	0.215946	0.213686	-----	-----	-----	-----	0.082311	-----
14	0.131375	0.124274	0.301485	-----	-----	0.303099	-----	-----
15	-----	-----	-----	-----	0.110394	-----	0.068431	-----
16	-----	0.039057	0.191091	0.10878	-----	0.08683	-----	-----
17	0.271175	-----	-----	-----	0.071014	-----	0.02195	-----
18	0.028405	0.037444	-----	0.017108	-----	-----	-----	-----
19	-----	-----	-----	-----	0.144287	0.038735	-----	-----
20	-----	0.067463	0.031311	-----	-----	0.245965	0.061007	-----
21	-----	-----	-----	-----	0.217883	-----	-----	-----
22	-----	-----	0.026146	-----	-----	0.008393	-----	-----
23	-----	-----	0.127179	-----	-----	-----	-----	-----
24	-----	-----	0.066817	-----	-----	-----	-----	-----
25	0.309877	-----	0.280826	-----	-----	-----	0.149128	-----
26	0.105875	0.744674	0.709167	-----	0.678825	0.995678	1	-----
27	0.174306	0.146869	0.680439	0.018399	0.771143	0.289671	-----	1
28	0.718528	0.731762	0.750484	0.744351	0.793415	0.804067	0.773079	0.04519
29	-----	-----	-----	0.177211	-----	-----	-----	-----
IRp	0.23060612	0.32154386	0.30847856	0.22207873	0.36157338	0.33634631	0.3112975	0.28615225
Riqueza específica	17	14	18	11	13	13	10	4
Bandas dominantes	3	4	6	2	4	3	3	1

H. Anexos Riqueza específica, intensidad relativa promedio y dominancia relativa de la región V3 del ADNr 16S

	Ocosingo	Laltic	La Maya	La Peña	La Regional	Dorados de la Selva	Queshill	Santa Rosa
1	0.451724	-----	0.118227	-----	-----	-----	0.340394	-----
2	0.509852	-----	0	-----	-----	-----	0	-----
3	0.429557	0.09064	0.685222	0.17936	0.1133	0.095567	0.816256	0.22661
4	0.34335	0.060591	0.616749	0.004926	0.016749	0.050739	0.748276	0.26749
5	-----	-----	0.163054	-----	-----	-----	-----	-----
6	-----	-----	0.231034	-----	-----	-----	-----	-----
7	-----	-----	0.127586	-----	-----	-----	-----	-----
8	-----	0.191133	-----	-----	-----	-----	-----	-----
9	0.457143	0.069951	-----	-----	-----	-----	0.35665	0.51133
10	-----	0	-----	-----	0.152709	-----	-----	-----
11	-----	0.026108	0.017734	-----	-----	-----	-----	-----
12	0.071429	0	0	-----	-----	-----	-----	-----
13	0	0.379803	0.049754	0.073399	-----	-----	-----	-----
14	0.155172	0	0	-----	-----	0.383251	-----	0.27143
15	-----	0.079803	0.122167	-----	0.107882	-----	-----	0
16	-----	0.155665	0.374384	-----	0.264039	-----	-----	0.19458
17	0.166502	0	0	0.171921	0	0.609852	-----	0
18	-----	0.074877	0.165517	0	0.300985	-----	0.483744	0.11576
19	-----	0.083744	0	0.24335	-----	-----	-----	0.10197
20	-----	0	0.269458	0.090148	-----	0.360099	-----	-----
21	0.072906	0.003448	0	-----	0.358128	-----	-----	-----
22	0	-----	0.352709	-----	0	-----	-----	-----
23	0.333596	-----	0	0.023645	0.229557	-----	-----	0.52217
24	-----	-----	0.353202	0	-----	0.910345	0.363744	-----
25	-----	-----	0.359606	0.112315	-----	0.662562	-----	-----
26	-----	0.744335	0	0.06798	0.394089	0	-----	0.47882
27	-----	0	0.045813	0	0.37931	0.48867	0.416749	0
28	0.238916	0.760591	0.068473	0.136453	-----	0.574877	0.426108	0.40591
29	-----	-----	-----	0.404926	-----	-----	0	0.08128
30	-----	-----	-----	0	-----	-----	0.151724	0
31	0.422611	0	1	0.310345	0.278177	-----	-----	0.04581
32	0.166965	0.524631	-----	-----	0.341379	-----	-----	0
33	-----	-----	-----	-----	0	0.347291	-----	0.2468
34	-----	-----	0.906404	1	1	0	0.381527	0.30571
35	0.067488	0.659606	-----	-----	0.203941	0.67734	-----	-----
36	-----	-----	-----	0.168966	0	-----	-----	-----
37	-----	-----	-----	0	0.325616	-----	-----	-----
38	1	1	0.334483	0.234483	0	1	1	1

39	0	-----	-----	-----	-----		0.355862	0.22463
40	0.202463	-----	-----	-----	-----	0.474384	0	0
41	0	0	-----	-----	-----	-----	0	0.57291
42	0.525025	0.597044	-----	-----	-----	-----	0.519212	-----
43	0	-----	-----	-----	-----	0.453202	0	-----
44	0.124138	-----	0.084729	0.243842	0.274581	-----	0.392611	0.48818
45	0	0.072414	-----	0	0	-----	0	-----
46	0.05468	0.135468	-----	0.241232	0.34335	-----	0.065025	-----
47	0	0	-----	0	0	-----	0.187685	0.09163
48	0.065025	0.140394	-----	0.10197	0.342857	0.052709	-----	-----
49	-----	-----	-----	0.110345	0	0.097537	-----	-----
50	-----	-----	-----	-----	0.278522	0	0.398522	0.0532
51	-----	-----	-----	-----	-----	0.171921	-----	-----
52	0.080296	-----	0.700493	-----	-----	0.161576	-----	-----
53	0	-----	-----	0.171626	-----	0	-----	0.13005
54	0.164039	-----	-----	-----	0.436946	0.477833	0.048768	-----
55	-----	0.098522	-----	-----	-----	0.470936	-----	-----
56	-----	0.145813	0.144828	-----	-----	-----	-----	-----
57	-----	-----	-----	0.044335	-----	-----	0.108374	-----
58	-----	-----	-----	0	0.191626	-----	-----	-----
59	-----	-----	-----	0.046305	0	-----	-----	-----
60		-----	-----	0	0.505419	-----	-----	0.25172
61	0.112315	0.520197	0.329557	0.208177	0	0.455665	0.404926	-----
62	0.107882	-----	-----	-----	0.289788	0	-----	-----
63	-----	-----	-----	-----	-----	0.323645	-----	-----
64	-----	-----	-----	0.150246	-----	-----	0.192611	-----
65	0.24335	-----	-----	0	0.029064	-----	0.473892	-----
66	0	0.389163	0.148768	0.163547	0	-----	0	-----
67	0.227586	-----	-----	-----	0.299655	-----	0.368966	0.19951
68	-----	-----	-----	-----	0.114286	-----	0.137931	-----
69	-----	-----	0.802463	-----	0.087192	-----	0.205419	-----
70	-----	-----	0	-----	-----	-----	-----	0.11626
71	-----	-----	0.303448	-----	-----	-----	-----	0
Riqueza especifica	27	23	27	25	27	22	25	24
IR promedio	0.26130808	0.29183088	0.32873563	0.18815368	0.28404248	0.42272732	0.37379904	0.29663
Dominancia Relativa	8	8	12	8	12	12	11	8

I. Parámetros fisicoquímicos

I1. a_w PASTA

Muestra Pasta	valor 1	valor 2	valor 3	Promedio	D. est
OcosingoQ1	0.943	0.943	0.943	0.943	0
OcosingoQ2	0.9400	0.939	0.937	0.938	0.001
Laltic Q1	0.938	0.938	0.937	0.937	0.0001
Laltic Q2	0.936	0.934	0.936	0.935	0.001
La Maya Q1	0.952	0.952	0.953	0.952	0.0005
La Maya Q2	0.949	0.950	0.951	0.950	0.001
La Peña Q1	0.900	0.894	0.896	0.896	0.003
La Peña Q2	0.897	0.898	0.897	0.897	0.0005
La Regional Q1	0.946	0.945	0.946	0.945	0.0005
La Regional Q2	0.936	0.929	0.932	0.932	0.003
Dorados de la Selva Q1	0.948	0.947	0.946	0.947	0.001
Dorados de la SelvaQ2	0.937	0.939	0.932	0.936	0.003
Queshill Q1	0.912	0.915	0.898	0.908	0.009
Queshill Q2	0.896	0.897	0.897	0.896	0.0005
Santa Rosa Q1	0.922	0.923	0.922	0.922	0.0005
Santa Rosa Q2	0.930	0.931	0.931	0.930	0.0005

I2. a_w FORRO

Muestra forro	valor 1	valor 2	Promedio	D. est
OcosingoQ1	0.906	0.908	0.907	0.001
OcosingoQ2	0.913	0.911	0.912	0.001
Laltic Q1	0.902	0.900	0.901	0.001
Laltic Q2	0.891	0.892	0.891	0.0007
La Maya Q1	0.952	0.952	0.952	0
La Maya Q2	0.950	0.951	0.950	0.0007
La Peña Q1	0.908	0.906	0.907	0.001
La Peña Q2	0.846	0.850	0.848	0.002
La Regional Q1	0.914	0.915	0.914	0.0007
La Regional Q2	0.908	0.906	0.907	0.001

Dorados de la Selva Q1	0.913	0.910	0.911	0.002
Dorados de la Selva Q2	0.907	0.902	0.904	0.003
Queshill Q1	0.906	0.904	0.905	0.001
Queshill Q2	0.852	0.847	0.849	0.003
Santa Rosa Q1	0.906	0.908	0.907	0.001
Santa Rosa Q2	0.909	0.908	0.908	0.0007

I3. pH PASTA

Muestra Pasta	valor 1	Valor 2	Valor 3	Promedio	D.est
OcosingoQ1	3.98	3.97	4.00	3.983	0.015
OcosingoQ2	4.15	4.00	4.16	4.103	0.089
Laltic Q1	3.71	3.72	3.71	3.713	0.005
Laltic Q2	5.27	5.30	5.27	5.280	0.017
La Maya Q1	5.24	5.26	5.26	5.253	0.011
La Maya Q2	4.97	4.96	4.96	4.963	0.005
La Peña Q1	3.78	3.76	3.77	3.770	0.010
La Peña Q2	3.8	3.81	3.8	3.803	0.005
La Regional Q1	3.91	3.91	3.9	3.906	0.005
La Regional Q2	3.89	3.92	3.91	3.906	0.015
Dorados de la Selva Q1	3.97	3.94	3.95	3.953	0.015
Dorados de la Selva Q2	4.46	4.53	4.51	4.500	0.036
Queshill Q1	4.37	4.35	4.36	4.360	0.010
Queshill Q2	4.21	4.21	4.21	4.210	0
Santa Rosa Q1	3.89	3.87	3.87	3.876	0.011
Santa Rosa Q2	3.90	3.90	3.91	3.903	0.005

I4. pH FORRO

Muestra Forro	valor 1	Valor 2	Valor 3	Promedio	D.est
OcosingoQ1	5.06	5.09	5.09	5.075	0.021
OcosingoQ2	5.50	5.51	5.51	5.505	0.007
Laltic Q1	5.04	4.98	4.98	5.000	0.034
Laltic Q2	5.05	5.04	5.05	5.046	0.005
La Maya Q1	5.68	5.66	5.76	5.700	0.052
La Maya Q2	5.51	5.53	5.51	5.516	0.011

La Peña Q1	5.18	5.17	5.19	5.180	0.010
La Peña Q2	5.13	5.14	5.10	5.123	0.020
La Regional Q1	5.00	5.00	5.02	5.006	0.011
La Regional Q2	5.07	5.06	5.09	5.073	0.015
Dorados de la Selva Q1	5.09	5.09	5.09	5.090	0
Dorados de la Selva Q2	5.51	5.52	5.51	5.513	0.057
Queshill Q1	5.08	5.07	5.08	5.076	0.057
Queshill Q2	5.06	5.06	5.05	5.056	0.057
Santa Rosa Q1	5.09	5.07	5.07	5.076	0.011
Santa Rosa Q2	5.00	5.00	5.02	5.006	0.011

I5. Acidez PASTA

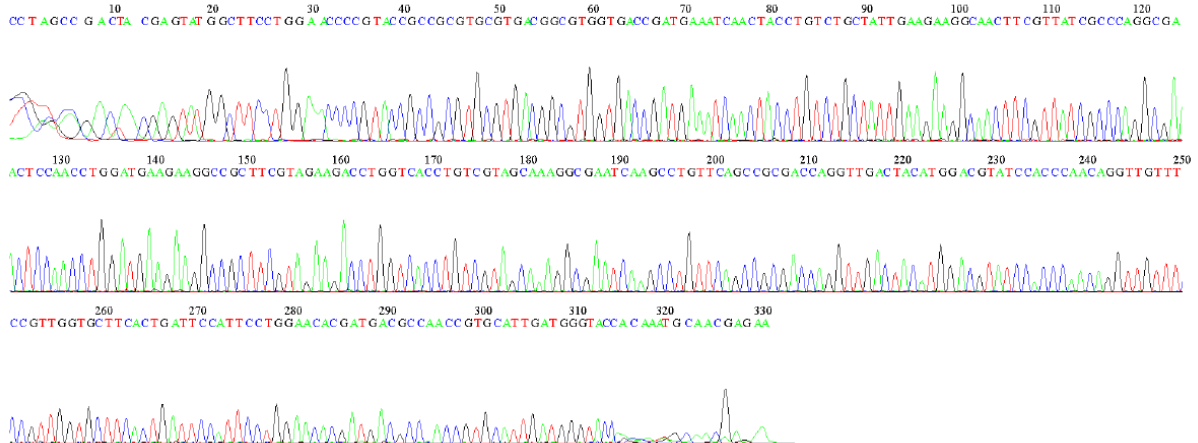
Muestra Pasta	valor 1	valor 2	valor 3	Promedio	D. est
OcosingoQ1	3.0	3.1	3.1	3.066	0.057
OcosingoQ2	3.2	3.1	3.1	3.133	0.057
Laltic Q1	2.6	2.6	2.7	2.633	0.057
Laltic Q2	2.6	2.5	2.5	2.533	0.057
La Maya Q1	3.2	3.1	3.1	3.133	0.057
La Maya Q2	2.3	2.3	2.2	2.266	0.057
La Peña Q1	2.7	2.8	2.8	2.766	0.057
La Peña Q2	3.4	3.3	3.3	3.333	0.057
La Regional Q1	2.6	2.6	2.7	2.633	0.057
La Regional Q2	2.6	2.6	2.6	2.600	0
Dorados de la Selva Q1	3.0	3.0	3.0	3.000	0
Dorados de la Selva Q2	1.4	1.3	1.4	1.366	0.057
Queshill Q1	3.0	2.9	2.9	2.933	0.057
Queshill Q2	3.2	3.3	3.3	3.266	0.057
Santa Rosa Q1	3.2	3.1	3.1	3.133	0.057
Santa Rosa Q2	2.7	2.6	2.6	2.633	0.057

I6. Acidez FORRO

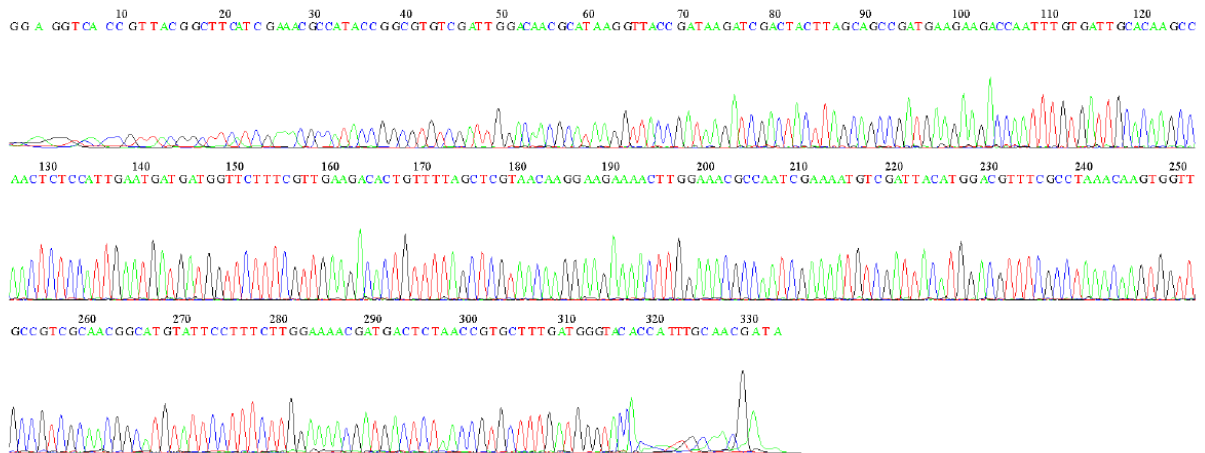
Muestra Forro	valor 1	valor 2	valor 3	Promedio	D. est
OcosingoQ1	2.5	2.6	2.6	2.566	0.057
OcosingoQ2	3.3	3.2	3.2	3.233	0.057
Laltic Q1	2.4	2.3	2.4	2.366	0.057
Laltic Q2	2.6	2.5	2.6	2.566	0.057
La Maya Q1	2.0	2.0	2.0	2.000	0
La Maya Q2	3.6	3.6	3.6	3.600	0
La Peña Q1	1.7	1.6	1.6	1.633	0.057
La Peña Q2	1.9	2.0	1.9	1.933	0.057
La Regional Q1	1.6	1.6	1.7	1.633	0.057
La Regional Q2	2.4	2.5	2.4	2.433	0.057
Dorados de la Selva Q1	2.5	2.6	2.6	2.566	0.057
Dorados de la Selva Q2	3.3	3.3	3.3	3.300	5.4 E ⁻¹⁶
Queshill Q1	3.2	3.2	3.2	3.200	5.4 E ⁻¹⁶
Queshill Q2	3.1	3.2	3.2	3.166	0.057
Santa Rosa Q1	2.0	2.1	2.1	2.066	0.057
Santa Rosa Q2	2.4	2.4	2.4	2.400	0

J. Electroferogramas de las secuencias de la microbiota bacteriana identificada en los Queso Bola de Ocosingo con el 99-100 % de identidad.

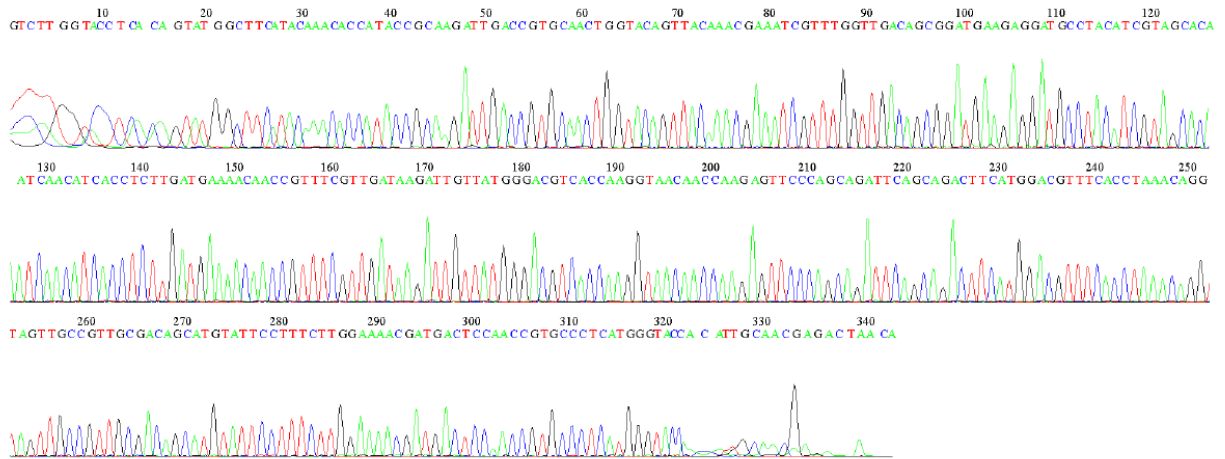
OM02- *Serratia marscecens*



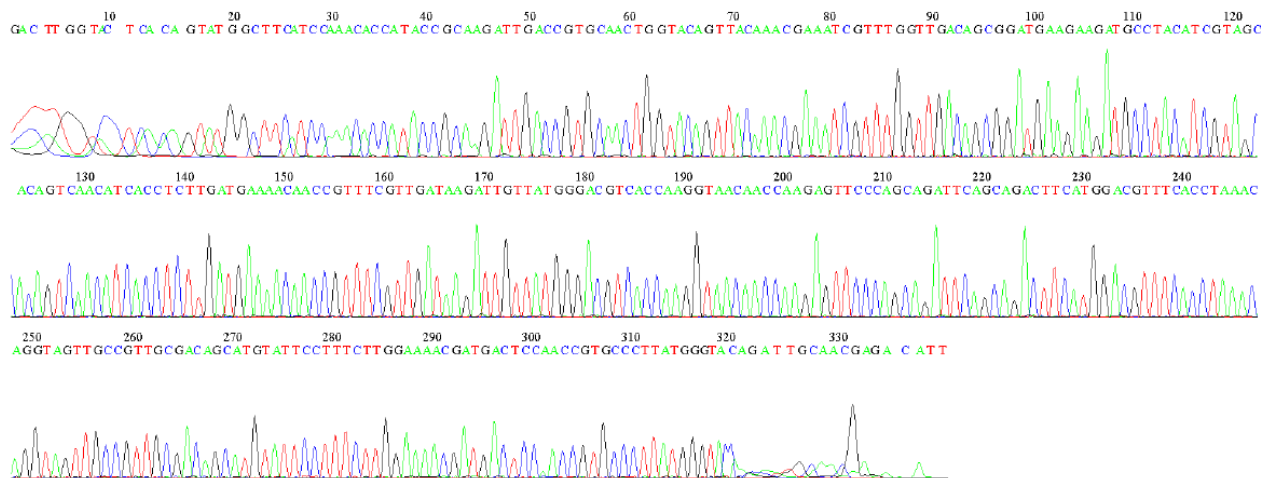
LM10- *Lactiplantibacillus plantarum*



RM19- *Enterococcus faecium*



OM03- *Streptococcus suis*



LM08- *Enterobacter bugandensis*

