



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

APLICACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA EN LA BÚSQUEDA DE BACTERIAS ÁCIDO
LÁCTICAS EN UN QUESO ARTESANAL MEXICANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

LINDA ARIADNA CORTÉS DÍAZ



MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRES GONZÁLEZ SARA VIA

VOCAL: Profesor: AGUSTÍN REYO HERRERA _____

SECRETARIO: Profesor: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH _____

1er. SUPLENTE: Profesor: GLORIA DÍAZ RUIZ _____

2° SUPLENTE: Profesor: JORGE ARTURO ABURTO ANELL _____

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 312, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): LINDA ARIADNA CORTÉS DÍAZ

(nombre (s) y firma (s))

RECONOCIMIENTOS

A la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch, por asesorar este gran proyecto en el cual participé.

A mis sinodales: la Dra. Amelia Farrés González Saravia y Agustín Reyo Herrera, por las valiosas observaciones realizadas a este trabajo.

A la Dra. Carmen Wachter (F.Q., UNAM), a la Dra. Lorena Gómez (UAM-I) y al Q.F.B. Alejandro Camacho (F.Q., UNAM) por colaborar en este proyecto al proporcionar cepas de bacterias ácido lácticas de identidad conocida.

A la M.C. Carolina Peña por su asesoría en la implementación de la técnica de PCR.

Este proyecto fue realizado con el financiamiento de:

Proyecto PAPIIT IN213109; “El queso Cotija: una fuente de compuestos funcionales y de microorganismos importantes en la inocuidad de alimentos”.

Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación”, periodo 2007-2008.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

Adelina Díaz Pérez y Julián Cortés Sandoval

Agradezco a Dios por haberme dado a los mejores padres del mundo.

Atribuyo todos mis éxitos a sus enseñanzas.

Gracias a sus cuidados, educación y sobre todo a su inmenso amor durante toda mi vida he logrado ser la persona quien soy.

Gracias por compartir conmigo todos esos días y noches de desvelo, por estar conmigo en mis alegrías y en mis tristezas.

Este logro no hubiera podido hacerlo sin su motivación y apoyo durante toda esta grata pero larga carrera.

A mi familia:

Agradezco el apoyo de toda mi familia por compartir conmigo momentos inolvidables.

A mis abuelos: Ofelia Sandoval Medina, Guadalupe Pérez[†] y José Díaz Cléto[†].

A mis tíos: Estela, José, Marisela y María Elena Cortés; Adela, Flor, Ofelia, Juana y José Díaz; Adelina Sandoval, Javier Platas[†], Lidia y Ana Platas.

A mis primos: Edgar, Josué, Vicky, Toñito, Itza y Odeth

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México

Por que en esta casa de estudios conocí a los verdaderos amigos y una excelente e incomparable educación. Gracias a todos los profesores que me formaron académicamente. Gracias por brindarme todo el apoyo para concluir con este sueño que ya es una realidad.

A Jocelyn

Por tu valiosa amistad que desde hace ya varios años la hemos podido mantener. Gracias por estar conmigo en otra etapa de mi vida y por compartir siempre un punto de vista diferente.

A Julieta y Edith

Por su valiosa amistad y compañía desde el inicio de la carrera. Gracias por su apoyo en todo momento.

A mis amigos

Angélica, Berenice, Jessica, Lizbeth, Paulina, Alejandro y Carlos por su amistad y apoyo. Por su apoyo y por compartir conmigo momentos inolvidables que hicieron que todo fuera más fácil. Gracias por su amistad.

A la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Por sus enseñanzas, por haberme apoyado en todo momento durante la realización de este proyecto, por su paciencia y sobre todo por darle el valor que requiere este trabajo.

Al equipo de trabajo Quirasco

Abraham, Berenice, Cindý, Paloma, Paty, Verónica García y Verónica Hernández. Gracias por apoyarme en la realización de este proyecto y sobre todo por brindarme su amistad y compañerismo.

A la Dra. Amelia Farrés y a la Dra. Amanda Gálvez

Por su atención y sus valiosas observaciones en cada uno de los seminarios.

A los integrantes del laboratorio 312

Carolina, Denise, Eliana, Israel, Mirna y Florencia. Gracias por su compañerismo, su atención y observaciones en cada uno de los seminarios. Al Sr. Rodrigo y Sr. Agustín por apoyar con el mantenimiento del laboratorio.

A Miguel Ángel Huerta Reyes

Por que eres una persona muy especial en mi vida, haz sido parte importante en mi desarrollo personal y académico. Gracias por tu apoyo y por compartir hermosos momentos durante todo este tiempo.

	<i>Página</i>
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	5
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 QUESO	7
2.1.1 <i>Proceso de elaboración</i>	7
2.2 QUESO COTIJA	11
2.2.1 <i>Generalidades</i>	11
2.2.2 <i>Proceso de elaboración</i>	14
2.2.3 <i>Composición química</i>	18
2.3 INOCUIDAD ALIMENTARIA	21
2.4 DIVERSIDAD MICROBIANA EN QUESOS	25
2.5 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)	28
2.5.1 <i>Papel de las bacterias ácido lácticas (BAL) en inocuidad alimentaria</i>	29
2.5.2 <i>Género Lactobacillus</i>	30
2.5.3 <i>Género Lactococcus</i>	31
2.5.4 <i>Género Streptococcus</i>	32
2.6 BAL PRESENTES EN EL QUESO COTIJA (ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO)	34
2.7 TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS	35
2.7.1 <i>REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</i>	36
2.7.2 <i>Optimización de las condiciones de reacción para la detección de microorganismos</i>	39
2.7.3 <i>Problemas de la PCR en la detección de microorganismos</i>	43
3. HIPÓTESIS	44
4. OBJETIVOS	44
4.1 OBJETIVOS GENERALES	44
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	44
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	45
5.1 DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS	45
5.1.1 <i>Muestras de queso Cotija</i>	45
5.1.2 <i>Cepas de BAL de identidad conocida</i>	46
5.2 TOMA DE MUESTRA	46
5.2.1 <i>Queso Cotija</i>	46
5.3 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO GENERAL	47
5.3.1 <i>Cuenta de mesófilos aerobios, hongos y levaduras</i>	48
5.3.2 <i>Cuenta de coliformes totales y fecales</i>	49
5.4 DETECCIÓN DE BAL POR PCR EN EL QUESO COTIJA	50
5.4.1 <i>Selección de cebadores</i>	50
5.4.2 <i>Prueba de especificidad de los cebadores seleccionados</i>	50
5.4.2.1 <i>Extracción de ADN</i>	52
5.4.2.2 <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	53

5.4.2.3 Detección de <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> y <i>Streptococcus</i> en el queso Cotija.....	55
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
6.1 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO GENERAL	57
6.2 DETECCIÓN DE LAS BAL POR MEDIO DE LA PCR EN EL QUESO COTIJA.....	63
6.2.1 Selección de cebadores	64
6.2.2 Pruebas de especificidad de los cebadores seleccionados.....	67
6.2.3 Detección de <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> y <i>Streptococcus</i> en el queso Cotija..	72
7. CONCLUSIONES.....	83
8. PERSPECTIVAS	84
9. ANEXO I.....	85
10. ANEXO II	102
11. BIBLIOGRAFÍA	125

ABREVIATURAS

BAL; Bacterias ácido lácticas

PCR; Reacción en Cadena de la Polimerasa

ADN; Ácido desoxirribonucleico

ARN; Ácido ribonucleico

BSA; Albúmina sérica bovina

DMSO; Dimetil Sulfoxido

ADNc; Ácido desoxirribonucleico complementario

Q1; muestra de queso número 1

Q2; muestra de queso número 2

.

.

.

Q10; muestra de queso número 10

SE; muestra de queso sin enriquecimiento

CE; muestra de queso con enriquecimiento

RESUMEN

El queso Cotija es elaborado artesanalmente con leche cruda de vaca. Es madurado durante un mínimo de 3 meses antes de salir a la venta, se caracteriza por su alto contenido de sal (NaCl) ~6% y sabor fuerte. En su proceso de elaboración no existe algún tratamiento térmico y no hay inoculación intencional de cultivos iniciadores. Por ser un producto para consumo humano, es de gran importancia determinar su calidad sanitaria. Esto se logró con un estudio microbiológico general realizado a diez diferentes muestras de queso Cotija. Se determinó la cuenta de microorganismos mesófilos aerobios (la cual está dentro del rango de 10^4 a 10^6 UFC/g_{queso}), hongos (<67 UFC/g_{queso}) y levaduras, las cuales únicamente se detectaron en cuatro de las diez muestras analizadas en cantidad muy variable entre ellas. El contenido de coliformes totales y fecales se encuentra dentro del rango reportado en la literatura. Con base a los resultados anteriores se puede afirmar que la calidad sanitaria de las diez muestras de queso Cotija fue aceptable. Una de las formas en que las bacterias ácido lácticas (BAL) pueden contribuir en la inocuidad del alimento es con la producción de ácidos orgánicos y bacteriocinas. En trabajos previos por medio de métodos microbiológicos tradicionales, se logró aislar cepas del género *Enterococcus* y *Lactobacillus* de algunas muestras de queso Cotija, este último género se aisló con dificultad debido a que su población no es predominante. En el presente trabajo se realizó la detección de BAL de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* en las diez muestras de queso Cotija, a través del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de una forma específica e independiente de cultivo. Se encontró que el género *Lactobacillus* está presente en el 100% de las muestras analizadas de Queso Cotija, en el 30% se detectó la presencia del género *Lactococcus* y una ausencia del género *Streptococcus* en todas las muestras. Adicionalmente se logró identificar la presencia de *Enterococcus faecium* en el 70% de las muestras. Al considerar el límite de detección del método, se puede inferir que estas BAL están presentes en una concentración mayor o igual a 10^4 UFC/g_{queso}.^(12, 44)

1. INTRODUCCIÓN

El queso Cotija es un producto lácteo fermentado, madurado, de pasta dura, desmoronable, de sabor fuerte y con alta concentración de sal (6%). Es elaborado de forma artesanal con leche cruda de vaca, desde hace más de 400 años en la Sierra de Jalisco-Michoacán. Entre las características más importantes a destacar del proceso de elaboración del producto está el que no existe inoculación intencional de cultivos microbianos y que en ninguna etapa del proceso se aplica algún tratamiento térmico. Actualmente cuenta con la Marca Colectiva Región de Origen, pues aún no ha obtenido la Denominación de Origen. Se pretende que los estudios científicos realizados permitan la creación de una norma que avale el producto. Recientemente se publicó el proyecto de norma para este queso (PROY-NMX-F-735-COFOCALEC-2009) y es el primer producto alimenticio artesanal que aspira a la obtención de una norma.⁽³⁾

Los microorganismos presentes en el queso Cotija son los responsables de otorgarle las características sensoriales propias, las cuales han sido ampliamente reconocidas en el extranjero ya que en el año 2006 ganó un premio internacional como el mejor queso extranjero del año, en Cremona, Italia⁽²⁾. En investigaciones previas del grupo de trabajo, se han aislado e identificado algunos microorganismos del queso Cotija con propiedades lipolíticas (*Bacillus pumilus*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus piscifermentans*, *Staphylococcus saprophyticus* subs. *saprophyticus*, *Yarrowia lipolytica* y *Candida zeylanoides*)⁽²⁹⁾ y proteolíticas (*Bacillus megaterium*, *Bacillus flexus*, *Bacillus licheniformis* o *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus mojavensis*, *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri*, *rodentium* o *carnaticus* y *Enterococcus faecalis*)⁽³⁰⁾.

Debido a las características de elaboración del producto es de gran importancia asegurar su calidad sanitaria. La microbiota influye directamente en la inocuidad del producto y es aquí en donde el papel de las bacterias ácido lácticas (BAL) es importante, debido a que producen ácidos orgánicos y bacteriocinas que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas.

Por métodos dependientes de cultivo se encontraron en el queso Cotija cepas de *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus paracasei*. El género *Enterococcus* se encontró como predominante. ^(10,16) Por métodos moleculares se identificó a *Vagococcus sp.* y a *Marinilactibacillus sp.* ⁽⁶³⁾

Las técnicas de microbiología tradicional son relativamente sencillas, pero hay que considerar que el proceso tiende a ser muy tardado y que es difícil aislar los microorganismos que se encuentran en bajas concentraciones. Los medios de cultivo empleados en el laboratorio, no necesariamente cumplen los requerimientos nutricionales de toda la microbiota presente en el alimento lo que dificulta su aislamiento.

El empleo de técnicas moleculares resulta más conveniente debido a que se puede realizar la búsqueda de los microorganismos de interés de una forma específica. El método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es el más empleado para este tipo de estudio ya que es muy sensible y específico, siempre y cuando se utilicen los cebadores y condiciones de reacción adecuadas, además se requiere menor tiempo de realización.

En este trabajo se planteó una búsqueda específica género-especie de BAL por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), como método alternativo de cultivo. Se seleccionaron tres géneros representativos *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, debido a que además de ser las BAL más utilizadas en la industria láctea, se han reportado como presentes en quesos artesanales elaborados con leche cruda de vaca. ^(25, 40)

2. MARCO TEÓRICO

2.1 QUESO ⁽⁵⁾

El queso es un derivado de la leche; se define como el producto que resulta de la precipitación de las caseínas, que deja como residuo el llamado suero de la leche. Para llevar a cabo este proceso se emplean básicamente dos métodos: por medio de la renina o cuajo, o bien, acidificar a llegar al punto isoeléctrico de las caseínas (pH 4.6).

Los pasos fundamentales para su elaboración incluyen la coagulación de la leche, el cortado del coágulo, la eliminación del suero (desuerado), el salado, el prensado y la maduración (si se requiere). Los quesos llamados “frescos”, son los más consumidos en México. El gusto mexicano está dirigido a los quesos suaves que recuerden lo más posible a la materia prima, es decir a la leche

2.1.1 Proceso de elaboración ^(5, 26)

La producción de todas las variedades de queso involucra generalmente un protocolo similar y algunos de los pasos son modificados para darle al producto las características deseadas. A continuación se describe cada uno de estos pasos:

- a) Selección de la leche: La composición del queso está fuertemente influenciada por la composición de la leche, especialmente el contenido de grasa, proteína, calcio y pH. A su vez, los constituyentes de la leche son influenciados por diversos factores incluyendo la raza del animal productor, su estado nutricional, salud y estado de lactación. Además, la leche debe de tener una buena calidad microbiológica y estar libre de contaminantes químicos y ácidos grasos libres, los cuales causan sabores indeseados en el queso, así como antibióticos, los cuales inhiben el crecimiento y la actividad enzimática de los cultivos bacterianos.

- b) Estandarización de la composición de la leche: De acuerdo a las variedades de queso, algunas requieren determinado contenido de grasa con respecto a materia seca, por lo que este contenido puede ser modificado por diferentes métodos como: la remoción de grasa por descremado natural, adición de leche desnatada, adición de crema, adición de leche en polvo, evaporada, entre otras. El calcio juega un rol mayor en la coagulación de la leche por la renina y el subsecuente procesamiento del coágulo, por lo que una práctica común es adicionar CaCl_2 (0.01%) a la leche quesera.
- c) Tratamiento térmico de la leche: Actualmente la leche es pasteurizada, esto es por razones de salud pública, además de que provee a la leche una calidad bacteriológica uniforme.
- d) Color del queso (opcional): El color es un atributo muy importante en los alimentos, y sirve como un índice de calidad, pero en algunos casos únicamente sirve para mejorar la apariencia. Los pigmentos propios de la leche son carotenoides, los cuales son obtenidos de la dieta del animal, especialmente del pasto fresco. Los carotenoides de la leche bovina pueden ser blanqueados por tratamiento con H_2O_2 o peróxido de benzoilo o enmascarado con clorofila u óxido de titanio (TiO_2). Estas prácticas no son permitidas en todos los países. Para obtener colores intensos se pueden adicionar carotenoides (extractos sintéticos o naturales), como el annato (*Bixa orellana*).
- e) Acidificación: Se lleva a cabo a través de la producción *in situ* de ácido láctico, debido a la fermentación de la lactosa por las bacterias ácido lácticas. Dichas bacterias han sido introducidas comercialmente en la manufactura del queso y entre las más comunes destacan *Lactococcus lactis*, *L. cremoris* y *L. bulgaricus*, que se añaden a la leche previamente acondicionada $35\text{-}37^\circ\text{C}$, en una concentración de 1% y se deja que actúen durante 30 a 40 minutos. En este tiempo transforman la lactosa en ácido láctico, lo que aumenta un 0.01-0.02% la acidez de la leche y reduce el pH a 5.3-5.5. Una alternativa para la acidificación

biológica es utilizar un ácido (usualmente ácido láctico o ácido clorhídrico) o un acidógeno (usualmente ácido glucónico- δ -lactona).

- f) Cuajado: En este paso se añade la renina u otro cuajo que puede ser de origen microbiano, cuya actividad enzimática durante 30 minutos provoca la coagulación de la leche mediante un fenómeno que se efectúa en dos pasos: 1) hidrólisis de la caseína κ (enlace 105-106) en *para*-caseína κ y el macropéptido, que trae consigo la pérdida del sistema de estabilización de las caseínas y 2) formación del coágulo por la acción del calcio sobre las caseínas α y β que precipitan. La coagulación se puede lograr también por: 1) acidificación a pH 4.6 y 2) acidificación a pH mayor a 4.6 (\sim 5.2) en combinación con un tratamiento térmico a \sim 90°C.
- g) Cortado: El coágulo se corta longitudinal y transversalmente con liras metálicas o cuchillos para deshidratarlo y concentrar los sólidos. Los cubos formados son de tamaño variable, de acuerdo con el queso deseado. Mientras más pequeños mayor será el desuerado lo que es deseable en quesos con bajo contenido de agua. La agitación lenta y el calentamiento aceleran la deshidratación ya que además se favorece una generación extra de ácido láctico que ocasiona que las micelas se unan más estrechamente para generar una estructura tridimensional continua de caseínas en la que queda atrapada la grasa y parte del suero.
- h) Salado: La sal contribuye al sabor y a detener la producción de ácido láctico. Una concentración de NaCl en el queso, comúnmente 0.7-4%, lo cual es equivalente a 2-10% sal en la base húmeda, es suficiente para interrumpir el crecimiento de los cultivos iniciadores. En algunas variedades esta operación se lleva a cabo al mezclar directamente la sal seca con la cuajada. Otras son saladas por inmersión en salmuera o por la aplicación de sal seca en la superficie. La cantidad de NaCl esta directamente relacionada con la reducción de la actividad acuosa (a_w) que ocurre cuando la sal (o cualquier soluto) es disuelta en agua.

- i) Moldeado: La caseína precipitada se coloca en moldes que se someten a presión para continuar con el desuerado, hasta llegar a la humedad final deseada, así como para darle forma.
- j) Maduración: Muchas variedades de queso coagulados con renina son madurados por un periodo que va de alrededor de 3 semanas a más de 2 años. Generalmente, la duración de la maduración está inversamente relacionada con el contenido de humedad del queso. La masa de caseína contenida en moldes se coloca en un cuarto con humedad relativa de 80-90% a 10-15°C. Bajo estas condiciones los microorganismos y las enzimas naturales y añadidas llevan a cabo una serie compleja de reacciones bioquímicas: las proteínas se degradan en aminoácidos (proteólisis), los hidratos de carbono (glicólisis) y lípidos en ácidos grasos de cadenas corta y larga (lipólisis). Los compuestos generados entran en una secuencia de transformaciones interrelacionadas muy compleja, mediante las cuales se produce la textura y las decenas de compuestos responsables del aroma y el sabor característico de cada variedad de queso. Los cambios que ocurren durante la maduración, y por lo tanto en el sabor, aroma y textura del queso maduro, son predeterminados por el proceso de manufactura. Se deben considerar la humedad, NaCl y pH, el nivel residual de actividad coagulante, el tipo de cultivo iniciador y en muchos casos por la adición o incorporación de un inóculo secundario a la leche o cuajada.

2.2 QUESO COTIJA

2.2.1 Generalidades

El Queso Cotija es producido por un número reducido de productores dispersos en un “santuario rancharo” al sur de la ciudad de Cotija, donde confluyen los estados de Jalisco y Michoacán (Sierra de Jal-Mich) en jurisdicción de los municipios de Santa María del Oro, Jalisco, sur de Tocumbo y de Cotija, Michoacán. Además se extiende a territorio de los municipios vecinos a los anteriores: norte de Jilotlán de los Dolores, oriente de Tamazula, sur del Valle de Juárez y de Quitupan, Jalisco, suroeste de Los Reyes, Peribán y Tancítaro, y norte de Buena Vista Tomatlán, Michoacán (*Figura 1*).



Figura 1. Sierra de Jalmich, región productora del queso Cotija ⁽²⁾

La Sociedad de Producción Rural (SPR-RI) o mejor conocida como la Asociación Regional de Productores de Queso Cotija obtuvo el 7 de marzo de 2005 del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) la Marca Colectiva del queso Cotija Región de Origen ⁽²⁾.

La Marca Colectiva, según la ley mexicana es *“aquel signo visible que distingue en el mercado los productos y servicios de las asociaciones, sociedades de productores, fabricantes, comerciantes o prestadores de servicios, legalmente constituidas, respecto de los productos o servicios de terceros”* ⁽⁵⁷⁾. Dicho signo visible corresponde a la etiqueta (*Figura 2*), así como la apariencia del queso que es de presentación cilíndrica, de formato grande (aproximadamente de 20 Kg) y de corteza “marmoteada” debido a las marcas del ixtle (fibra de maguey) con la cual fue envuelto al moldear (*Figura 3*). La Marca Colectiva representa una protección oficial y con ella una ventaja competitiva del producto en el mercado, dando garantía de autenticidad y calidad a los consumidores, así como un precio más justo para los productores ⁽²⁾. El queso Cotija aún no ha obtenido la Denominación de Origen*.



Figura 2. Etiqueta Marca Colectiva Región de Origen ⁽²⁾

El queso Cotija es un queso estacional, es decir, de producción limitada, ya que sólo se produce de julio a octubre, los meses lluviosos. Se puede encontrar en el mercado a partir de diciembre. ⁽²⁾

* La Denominación de Origen según el Acuerdo de Lisboa, se trata de *“la denominación geográfica de un país, una región o de una localidad que sirva para designar un producto originario del mismo y cuya calidad o características se deben exclusiva o esencialmente al medio geográfico, comprendidos los factores naturales y los factores humanos”* ⁽⁵⁷⁾.

Se pretende que los estudios científicos realizados de él, permitan en un futuro cercano la creación de una norma mexicana que avale el producto, ya que actualmente la norma vigente para quesos NOM-121-SSA1-1994, *Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias*, únicamente contempla a los producidos a partir de leche pasteurizada, lo cual deja en desventaja a los quesos artesanales mexicanos que son ampliamente consumidos en toda la República Mexicana. Existe una gran variedad de quesos artesanales mexicanos y deben ser resguardados como parte de nuestro legado culinario y cultural. Es importante conservar su manufactura artesanal de forma estandarizada y siguiendo las buenas prácticas de manufactura, ya que el hecho de no ser productos industrializados es lo que los hace tan particulares.

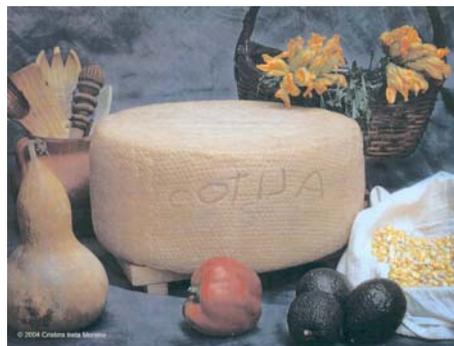


Figura 3. Queso Cotija Auténtico⁽²⁾

Como primer paso se publicaron unas “Reglas de uso” que recogen el conocimiento tradicional de los habitantes de la sierra, respecto del manejo de su medio geográfico, de sus recursos naturales y de sus pautas culturales, del manejo del ganado y de los ranchos, del proceso de elaboración, maduración y comercialización del queso⁽²⁾.

2.2.2 Proceso de elaboración

De acuerdo a las Reglas de Uso el queso deberá producirse a partir de leche entera, sin la adición de compuestos químicos o análogos de leche u otros ingredientes que no sean sal y cuajo. Solamente podrán ser añadidos cultivos microbianos que refuercen la inocuidad del producto ⁽²⁾.

El proceso de elaboración del queso Cotija que llevan a cabo los productores de acuerdo a sus costumbres y con calidad controlada, se ilustra en la *Figura 4* y se describe como sigue: ^(2, 29, 31)

1. Ordeña. La leche empleada debe ser recién ordeñada del día, proveniente de ganado criollo o híbrido (cruza de diversas razas) alimentado por libre pastoreo, únicamente en praderas naturales o inducidas localizadas en la región que protege la marca. Toda la leche utilizada para la elaboración del queso deberá ser fresca y provenir de las vacas ordeñadas durante los meses de lluvia (junio a octubre).

Esta operación se lleva a cabo generalmente entre 7 y 9 a.m. La persona que se dedica a ordeñar las vacas se tiene que lavar las manos muy bien, así como limpiar la ubre de las vacas con un trapo limpio como pasos previos. La persona que efectúe la ordeña no podrá acarrear al resto del ganado para evitar la contaminación cruzada. La mezcla de la leche se hace pasar por cedazos limpios para retener cualquier materia extraña antes de su utilización. La leche recién ordeñada presenta pH 7 y una temperatura de 37-38°C.

2. Reposo. La leche obtenida se deja reposar en un recipiente de acero inoxidable limpio, aunque también se utilizan recipientes de plástico y cazos grandes para contener la leche, por un período aproximado de 3 a 4 horas a temperatura ambiente (20 a 25°C) antes de agregar el cuajo.

3. Cuajado. Una vez que la leche alcanza la temperatura óptima, alrededor de 34°C y un pH cercano a 7, se le incorpora el cuajo mezclándolo rápidamente. Su

dosificación no está estrictamente controlada (~10 mL cuajo/100L leche) por lo que se obtienen tiempos y puntos de coagulación variable. Generalmente para este queso, el tiempo de cuajado es alrededor de una hora.

El cuajo debe de provenir del extracto enzimático del estómago de rumiantes, elaborado higiénicamente por los mismos productores de queso, a partir del cuajo de rumiantes jóvenes o en su defecto, se puede utilizar cuajo comercial de origen natural no microbiano (ej. Marca Cuamex ó Cuajo XXX estandarizado).

4. Cortado. En esta etapa el productor verifica la consistencia de la cuajada cruzándola con una cuchara o un cuchillo, los cuales se limpiaron previamente con agua hirviendo. Una vez alcanzado el punto deseado, se corta en grumos equivalentes en tamaño aproximado a un grano de maíz (dependiendo del productor puede variar el tamaño).

5. Desuerado. La mezcla del suero y cuajada se dejan reposar hasta que la cuajada cortada se asiente en el fondo del recipiente y se separe del suero.

6. Manteado. Se utiliza una tela de algodón para desuerar la cuajada por autocompresión y se deja escurrir en las mesas de acero inoxidable.

7. Quebrado. Esta operación consiste en romper la cuajada obtenida de manera manual (corte tosco) o con un cuchillo (cortes amplios), para favorecer un poco más el desuerado por exudación sobre una mesa de acero inoxidable, la cual es lavada previamente con agua hirviendo o con el mismo suero que se obtuvo en el proceso.

8. Salado. La sal a utilizar deberá ser de de grano libre de materia extraña, obtenida mediante proceso artesanal para que tenga la consistencia necesaria para su incorporación. Por lo general los productores utilizan la sal proveniente del estado de Colima, que se incorpora directamente a la cuajada y se amasa

manualmente para homogenizarla. La dosificación de la sal no se realiza de manera precisa pues depende de cada quesero, que a pesar de contar con “medidores muy rústicos” no siempre lo utilizan. La cantidad incorporada es aproximadamente entre 138 y 140 g por cada 20 L de leche cuajada.

En algunas ocasiones la cuajada ya salada se deja reposar sobre la artesa a temperatura ambiente para incorporar al día siguiente una cantidad equivalente de ésta y así obtener el queso del tamaño deseado.

9. Moldeado. La cuajada es colocada envuelta en dos piezas de yute o ixtle (fibra de maguey) dentro de un molde de acero inoxidable de forma cilíndrica y gran tamaño. El objetivo de esta operación es darle forma al producto y así obtener la presentación tradicional cilíndrica, cuyas dimensiones son 40 cm de diámetro y 18 cm de altura con un peso de alrededor de 20 Kg.

10. Prensado. La pasta fajada se prensa de 18 a 24 horas. Generalmente se emplean piedras de entre 50 y 90 Kg, aunque en algunas ocasiones se emplean prensas rústicas de tornillo.

11. Oreado. La pasta ya prensada se mantiene fajada para que no pierda el formato cilíndrico tradicional del queso Cotija. Se voltea diariamente hasta que deja de escurrir suero (“hasta que se orea”) durante 15 días o hasta que adquiera la firmeza necesaria para que cada pieza pueda ser manipulada.

12. Maduración. El queso se desfaja (quita el aro) cuando la consistencia es adecuada, pero se continúa volteándolo alternando la cara expuesta al medio diariamente durante los primeros tres meses de su vida. La superficie del queso se limpia con un lienzo limpio y suave, en un lugar cerrado, limpio y con ventilación, para que no se produzca una contaminación por plagas (moscos, insectos, etc.).

El queso Cotija *Región de Origen* deberá tener un mínimo de tres meses de vida dentro del área geográfica que protege la marca, considerando el inicio de su vida a partir del retiro de la prensa.

Por su tiempo de añejamiento, afinado o maduración se subclasificará en: ⁽²⁾

- a) Añejo; cuando un queso tenga de tres a seis meses de vida
- b) Rendido; cuando un queso tenga más de seis meses de vida

13. Venta y distribución. Después de al menos 3 meses de maduración, el producto se encuentra listo para su consumo ya sea para autoconsumo o mediante la venta de tiendas locales, ferias, mercados, etc. Se almacena sin refrigeración.

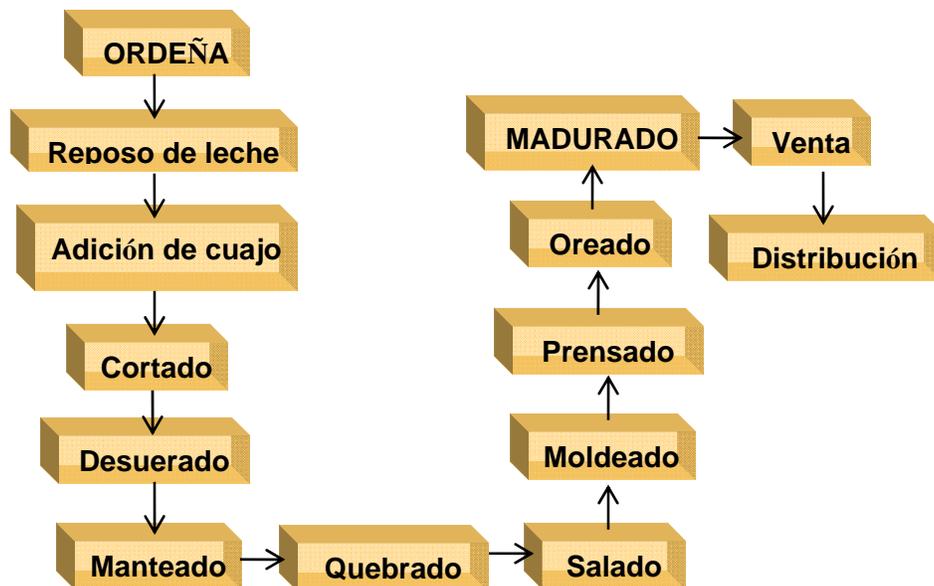


Figura 4. Diagrama de elaboración del Queso Cotija Región de Origen ⁽³¹⁾

Entre los puntos a destacar de la elaboración del queso Cotija, están que en ninguna etapa del proceso de elaboración se aplica algún tratamiento térmico y que no existe inoculación intencional de cultivos iniciadores.

2.2.3 Composición química

La composición química promedio del queso Cotija Región de Origen, así como algunos parámetros fisicoquímicos de calidad importantes por su efecto inhibitorio de microorganismos indeseables en el producto y que de alguna manera contribuirán a prolongar la vida de anaquel, se muestran en la *Tabla 1*.⁽³¹⁾

Tabla 1. Composición química promedio del queso Cotija Región de Origen

PARÁMETRO	COMPOSICIÓN	
	Base húmeda	Base seca
Agua (%)	32-40	
Sólidos totales (%)	60-68	
Proteína total (%)	mín. 27	mín. 39
Grasa butírica (%)	mín. 24	mín. 37
Minerales (%)	5.8-7.2	8.7-11.2
NaCl (%)	2.6-4.0	4.7-7.4
Carbohidratos (%)	0.08-0.15	0.12-0.24
Acidez (% ácido láctico)	0.20-0.32	
pH	4.8-5.2	
a_w	máx. 0.90	
kcal/100 g queso* (teórico)	mín. 324	

(Hernández, 2007)

* Considerando que el aporte de las proteínas y carbohidratos es de 4 kcal/g y lípidos 9 kcal/g

El crecimiento de microorganismos en un queso se ve afectado por algunos factores como: la actividad del agua (a_w), concentración de sal, potencial óxido-reducción, pH, la presencia o ausencia de bacteriocinas (producidos por algunos cultivos), entre otros. A continuación se describe el efecto de algunos de estos factores específicamente en el queso.⁽²⁶⁾

➤ Actividad del agua (a_w)

Todos los microorganismos requiere de agua para crecer, pero la disponibilidad del agua es el factor más importante que la cantidad total de agua presente. La disponibilidad de agua es expresada en términos de actividad de agua (a_w), la cual es definida como la relación de presión de vapor sobre el queso (p) y la del agua pura presente (p_o) a determinada temperatura:

$$a_w = \frac{p}{p_o}$$

Las proteínas en el queso son hidratadas y esta agua “unida” no está disponible para el crecimiento bacteriano. La hidrólisis de proteínas a péptidos y amino ácidos y de los lípidos a glicerol y ácidos grasos durante la maduración, reduce la disponibilidad del agua. En adición la sal y ácidos orgánicos (lactato, acetato y propionato) son disueltos en la humedad del queso y reducen la presión de vapor. Cada uno de estos factores reduce el a_w del queso durante la maduración.

Las levaduras crecen a menor a_w que las bacterias y los hongos crecen a valores aún más bajos. La mayoría de las bacterias requieren un a_w mínimo de alrededor de 0.92 para crecer. El límite para la mayoría de las levaduras es alrededor de 0.83, pero las levaduras osmofílicas crecen a valores de a_w menores a 0.60, mientras que los hongos tienen un límite de a_w de alrededor de 0.75. Las bacterias ácido lácticas (BAL) generalmente requieren valores altos de a_w que otras bacterias.

➤ Sal (NaCl)

La concentración de NaCl para prevenir contaminación microbiana en alimentos requerida depende de la naturaleza del alimento, su pH, y su contenido de humedad, pero generalmente menos del 10% es suficiente. El mayor factor inhibitorio es probablemente la reducción en el a_w , que ocurre cuando la sal (o cualquier soluto) es disuelto en agua. Los iones por si solos también son importantes (ej. el Na^+ es un inhibidor mucho más efectivo que el K^+).

➤ Potencial Óxido-Reducción

El potencial óxido-reducción (E_h) es una medida de la capacidad de los sistemas químicos o bioquímicos para oxidarse (pérdida de electrones) o reducirse (ganancia de electrones).

El E_h de la leche es aproximadamente + 150mV, mientras que el del queso es de aproximadamente -250 mV. El mecanismo exacto por el cual el E_h del queso es reducido no esta claro pero es con cierta certeza relacionada a la fermentación de la lactosa a ácido acético, por los cultivos iniciadores durante su crecimiento y es probablemente relacionado a la reducción de las pequeñas cantidades de O_2 en la leche a H_2O (o a H_2O_2 y luego a H_2O). Debido a estas reacciones el queso es un sistema esencialmente anaeróbico, en el cual los microorganismos facultativos o anaerobios obligados pueden crecer.

➤ pH y ácidos orgánicos

La mayoría de las bacterias requieren un pH neutro para un crecimiento óptimo y tienen un crecimiento pobre a valores de pH menores a 5.0. El pH en la cuajada del queso antes de su manufactura generalmente se encuentra entre 4.5-5.3, por lo que valores de pH bajos no permiten la sobrevivencia de especies ácido-sensitivas. Los principales ácidos orgánicos encontrados en el queso son el acético, láctico y propiónico, los dos últimos son los inhibidores más efectivos en este producto.

2.3 INOCUIDAD ALIMENTARIA

La inocuidad de los alimentos es un tema de salud pública de gran interés a nivel mundial. Las enfermedades transmitidas por los alimentos afectan la salud en forma importante. Millones de personas se enferman y muchas mueren en el mundo como resultado de la ingesta de alimentos no inocuos. La diarrea es el síntoma más común de enfermedad transmitida por los alimentos, pero otras consecuencias serias incluyen insuficiencia renal y hepática, trastornos cerebrales, neurológicos y muerte. Las complicaciones debilitantes a largo plazo de la enfermedad transmitida por los alimentos incluyen artritis reactiva y parálisis.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos pueden ser causadas principalmente por peligros microbiológicos y químicos.

- **Riesgos microbiológicos.** En muchos países se han registrado durante las últimas décadas aumentos significativos de la incidencia de enfermedades provocadas por microorganismos transmitidos principalmente por los alimentos, como *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. Han surgido nuevos y graves peligros como *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica, *Listeria monocytogenes* y la encefalopatía espongiiforme bovina.

- **Riesgos químicos.** Entre los contaminantes químicos de los alimentos se incluyen toxinas naturales como las micotoxinas y las toxinas marinas, contaminantes ambientales como el mercurio y el plomo y sustancias que se producen de manera natural en las plantas. En la cadena alimentaria se usan de manera deliberada aditivos alimentarios, micronutrientes, plaguicidas y medicamentos veterinarios, sin embargo debe asegurarse previamente que su uso sea seguro. ⁽⁵⁶⁾

Uno de los principales riesgos a la salud en el caso del queso Cotija es el microbiológico, esto es debido a las características de elaboración del producto.

Como ya se mencionó es elaborado artesanalmente con leche cruda de vaca y su proceso de elaboración no incluye algún tratamiento térmico.

En la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, *Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias*, así como en el anteproyecto de norma mexicana para el queso Cotija (PROY-NMX-F-735-COFOCALEC-2009) se establece la determinación de microorganismos indicadores, así como la determinación de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.^(51, 3)

Con excepción de *Salmonella* spp. y *S. aureus*, la mayoría de los ensayos para el aseguramiento de la calidad utilizan microorganismos indicadores, más que ensayos directos para un riesgo específico. Algunos de los microorganismos indicadores más comúnmente utilizados son el grupo de los *Enterococos*, Coliformes fecales y *E. coli*.⁽¹⁸⁾

El criterio microbiológico para determinar la seguridad sanitaria de un alimento puede utilizar ensayos para microorganismos indicadores cuya presencia sugeriría la posibilidad de un riesgo microbiológico.

Se ha sugerido que los indicadores ideales de la calidad del producto o vida de anaquel deben de tener los siguientes criterios:

- Deben de estar presentes y ser detectables en todos los alimentos cuya calidad se desea determinar.
- Su crecimiento y cantidad debe tener una correlación inversa con la calidad higiénica del producto.
- Deben ser fácilmente detectables y cuantificables, además deben ser claramente distinguibles de otros microorganismos.
- Deben ser cuantificables en un periodo corto de tiempo, idealmente en un día de trabajo.

El grupo de **coliformes** son bacterias aerobias y aerobias facultativas, gram negativas, no formadoras de esporas. Estas bacterias fermentan lactosa con formación de gas a las 48 h a 35 °C. Esta definición es algo operacional más que una definición taxonómica, el grupo coliforme incluye una variedad de organismos principalmente de origen intestinal. El grupo coliforme incluye a *Escherichia coli*, a *Klebsiella pneumoniae* y a *Enterobacter aerogenes*.⁽³⁹⁾ *E. coli* es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, la cual incluye varios géneros como los patógenos conocidos *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*.⁽²⁴⁾

La falta de certeza en cuanto a su filiación taxonómica y la imprecisa correlación entre los métodos recomendados para la detección de coliformes han presentado problemas. La técnica de Número Más Probable (NMP), también llamada técnica de dilución en tubo es la empleada más comúnmente. Ésta proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo, la que disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado. Un problema que se presenta es que algunas cepas de *Escherichia coli* no producen gas a partir de la lactosa o lo hacen después de 48 horas, por lo que no se les identifica por medio de esta técnica.⁽⁴⁹⁾

En el trabajo de Estrada (2006) se demostró que la técnica de NMP subestima hasta por un orden de magnitud la cantidad de microorganismos coliformes, a comparación de los métodos basados en la cuenta en placa con medios selectivos. En esta investigación se estandarizó la técnica de microfiltración para ser aplicada a un alimento sólido y se determinó que esta técnica es más sensible y permite obtener resultados en un menor tiempo en comparación con la técnica de NMP, es más sencilla de realizar y se puede reconocer la presencia de coliformes y *Escherichia coli* en un solo ensayo, con el empleo del medio de cultivo selectivo ColiBlue24®.⁽²¹⁾

La determinación de **microorganismos aerobios** puede ser un componente del criterio microbiológico para el aseguramiento de la calidad de un producto, cuando

se utilizan los siguientes criterios para: a) monitorear alimentos para el cumplimiento con los estándares o normas establecidas por diferentes agencias regulatorias y b) monitorear alimentos para el cumplimiento con especificaciones adquiridas ⁽¹⁸⁾. Estos criterios no se pueden aplicar para un producto como el queso Cotija, ya que en su proceso de elaboración no hay algún tratamiento térmico, por lo que no cumple con lo establecido en la normatividad mexicana actual para quesos. Además sus productores no cuentan con un Sistema de Calidad.

Otro método comúnmente utilizado para indicar la calidad de diferentes productos alimentarios es la determinación de **mohos** y **levaduras**. Los mohos y levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la microbiota normal de un alimento, como agentes contaminantes y en los equipos sanitizados inadecuadamente. Provocan el deterioro fisicoquímico de los alimentos debido a la utilización en su metabolismo de los carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos originando mal olor, alterando el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados. Además los mohos y levaduras pueden sintetizar metabolitos tóxicos termoresistentes, capaces de soportar algunas sustancias químicas, así como la irradiación y presentan capacidad para alterar sustratos, permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas. ⁽⁴⁸⁾

La presencia de levaduras no necesariamente es un indicativo de malas prácticas de manufactura en el queso Cotija o en quesos de elaboración similar, ya que por el contrario muchas de ellas van a favorecer las características sensoriales del producto. Ocasionalmente las levaduras son relacionadas en el deterioro de queso, debido a la producción de gas (CO₂) que produce hoyos en el queso o al desarrollo de sabores indeseables. ⁽²⁶⁾

2.4 DIVERSIDAD MICROBIANA EN QUESOS

La microbiota asociada a los quesos contribuye a la biopreservación y desarrollo de propiedades organolépticas de los mismos. Descifrar la diversidad microbiana y el funcionamiento de estos ecosistemas es un reto para un control de la calidad y seguridad del alimento. ⁽³³⁾

Al principio del proceso de elaboración del queso, los cultivos iniciadores de bacterias ácido lácticas (BAL) crecen rápidamente para producir ácido láctico a partir de la lactosa durante el proceso de fermentación ⁽⁸⁾. Los cultivos iniciadores pueden contribuir en la maduración del queso, en donde sus enzimas son involucradas en la proteólisis y conversión de amino ácidos en compuestos de sabor. Las bacterias iniciadoras pueden ser definidas como aquellas cepas que producen suficiente ácido para reducir el pH de la leche a < 5.3 en 6h a 30-37°C (Tabla 2). ⁽⁷⁾

El queso Cotija no es adicionado con cultivos iniciadores por lo que la microbiota de éste proviene de las materias primas (leche cruda de vaca y sal de grano), así como de cada una de las etapas del proceso, sobre todo aquéllas que se llevan a cabo manualmente y del medio ambiente de la región de origen.

Durante los primeros días de la maduración del queso inicia la actividad de la flora microbiana secundaria, la cual está compuesta por BAL no iniciadoras, hongos y/o levaduras (Tabla 3). ⁽⁷⁾

Las BAL no iniciadoras son lactobacilos y pediococos mesofílicos que forman una gran porción de la flora microbiana en muchas variedades de quesos durante su maduración. No son parte de la flora iniciadora normal, generalmente no crecen bien en leche y no contribuyen en la producción de ácido ⁽⁷⁾. Su papel tiene que ver estrictamente con la maduración, debido a sus propiedades tales como su actividad proteolítica, lipolítica y antagonista y debido a su potencial probiótico. Las

cepas probióticas de lactobacilos son actualmente muy utilizadas para dar al consumidor beneficios a la salud. ⁽⁸⁾

Los hongos y/o levaduras colonizan la superficie, permitiendo el establecimiento de la comunidad bacteriana ligeramente ácido tolerante (*Arthobacter arilaitensis*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Brevibacterium linens* y *Corynebacterium casei*). ⁽³³⁾

En el queso madurado Cantal proveniente de Francia el cual es elaborado a partir de leche cruda de vaca, se han determinado compuestos volátiles que repercuten el sabor tales como etanol, etil ésteres y compuestos de cadena corta, entre otros. Su producción es atribuida a las levaduras *Yarrowia lipolytica*, *Pichia fermentans* y *Kluyveromyces lactis*, presentes en este producto ^(59, 15). En el queso Cotija, se han logrado aislar cepas de *Yarrowia lipolytica* y *Candida zeylanoides*, las cuales presentan actividad lipolítica ⁽²⁹⁾, así como a *Candida parapsilosis* y *Kluyveromyces lactis*. ⁽⁴¹⁾

Tabla 2. Bacterias ácido lácticas (BAL) iniciadoras identificadas en quesos

BAL iniciadoras en quesos			
Género	Especie(s)	Queso	Fuente
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. helveticus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Parmesano	Beresford et. al. (2001)
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i>	Cotija, queso fresco mexicano, Toma piemontese	Cortés (2009)*, García B.E., et. al. (2007), Fortina, et. al. (2003)
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	Cotija	Zuñiga (2009), Bravo (2008), Cortés (2009)*
	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i>	Cheddar, Feta, Mozzarella, Cabrerio, Venado Hispánico y Toma piemontese	Ogier et. al.(2008), Fortina et. al.(2003)
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>	Emmental, Gruyère, Parmesano, Grana, Mozzarella y Cheddar	Delorme (2008), Beresford

* Detectados en el presente trabajo

Tabla 3. Flora secundaria típica de quesos

BAL no iniciadoras en quesos			
Género	Especie(s)	Queso	Fuente
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. paracasei</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i>	Feta, quesos tradicionales Griegos, Kefalotyri, Jarlberg, Noruegia, Herrgard, Greve, Gouda, Cabrales, Majorero, Arzua, Serpa, Montasio y Toma piemontese	Beresford et. al. (2001), Fortina et. al. (2003)
	<i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. bifementans</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. farciminis</i> y <i>L. kefir</i>	Cheddar	Beresford et. al. (2001)
	<i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i>	Cotija	Bravo (2008), Delgado (2008), Cortés (2009)*
Otros (Beresford et. al. (2001))			
Hongos		Levaduras	
Microorganismo	Queso	Microorganismo	Queso
<i>Penicillium roqueforti</i>	Roquefort, Gorgonzola, Stilton y Danés azul	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>	Danés azul, Weinkase, Romadour, Limburger, Tilsit, Roquefort, Cabrales, Camembert y St. Nectaire
<i>Penicillium camemberti</i>	Camembert, Brie	<i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Candida zeylanoides</i> , <i>Candida parapsilosis</i> y <i>Kluyveromyces lactis</i>	Cotija [García V. (2006), Martínez (2009)]
<i>Mucor</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Sporotrichum</i> y <i>Penicillium</i>	St. Nectaire y Tome de Savoie		

* Detectados en el presente trabajo

2.5 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

Las bacterias ácido lácticas son bacilos y cocos gram-positivos que producen ácido láctico como mayor o único producto de fermentación, estas bacterias son anaerobias aerotolerantes.

En la naturaleza existen dos subgrupos de BAL, cuya clasificación depende de los productos que forman durante la fermentación de los azúcares. Un grupo es llamado homofermentativo, el cual produce prácticamente ácido láctico como único producto de fermentación. El segundo grupo es llamado heterofermentativo, el cual produce otros productos principalmente etanol y CO₂, así como lactato. ⁽³⁹⁾

Algunas cepas de BAL son Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS por sus siglas en inglés), las cuales han sido utilizadas en el procesamiento de alimentos fermentados por siglos. Los beneficios a la salud o efectos probióticos han sido atribuidos a cepas específicas, esto ha sido objeto de intensivas investigaciones ^(9, 14, 23, 37, 60). Se ha encontrado que ayudan en el tratamiento de desórdenes intestinales, tales como la intolerancia a la lactosa e infecciones gastrointestinales. También se han encontrado asociaciones de estas bacterias en el metabolismo del colesterol ⁽⁶⁰⁾. Una de las recientes aplicaciones de los probióticos es en el tratamiento de gastritis, úlceras pépticas y cáncer gástrico debido a que inhiben el crecimiento de *Helicobacter pylori* la bacteria responsable de estos desórdenes. ⁽²²⁾

Para diferenciar a las BAL en géneros, se utilizan patrones de fermentación de la glucosa en condiciones estándares para la producción de CO₂. Para distinguir entre algunos cocos se utilizan diferentes temperaturas de crecimiento (10°C y 45°C). También la tolerancia a la sal (6.5% NaCl) se emplea para distinguir entre enterococos, lactococos y estreptococos. ⁽⁶⁰⁾

Se han logrado identificar BAL a partir de muestras ambientales, como en el caso de los sedimentos costeros de Yucatán. Se identificaron BAL de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Pediococcus*, así como de la familia *Lactobacillale* y *Carnobacteriaceae* ⁽²⁰⁾. También se han logrado aislar cepas de *Lactococcus lactis* del tracto gastrointestinal de un pescado en Japón, y se demostró su capacidad halotolerante ⁽³⁴⁾. Aunque los lactobacilos y lactococos comúnmente no toleran altas concentraciones de sal ⁽⁶⁰⁾, las cepas mencionadas tienen la característica de ser halotolerantes debido a las características del medio de donde fueron aisladas.

El queso Cotija como se mencionó, tiene una alta concentración de sal de grano, por lo que la capacidad halotolerante de los microorganismos en el queso es muy importante, además de que probablemente se estén inoculando cepas de BAL de origen marino.

2.5.1 Papel de las bacterias ácido lácticas (BAL) en inocuidad alimentaria

La capacidad de las bacterias ácido lácticas de producir sustancias antimicrobianas ha sido utilizada históricamente para preservar alimentos. La conservación de la leche por fermentación se ha utilizado desde hace siglos.

La fermentación reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y produce un rango de moléculas orgánicas de peso molecular pequeño que exhiben actividad antimicrobiana, los más comunes son el ácido láctico, acético, y propiónico. La disminución de pH en el alimento inhibe el crecimiento de bacterias ácido-sensitivas. ⁽⁶⁰⁾

Existen diversos estudios acerca de la producción de bacteriocinas de diferentes géneros de BAL, las cuales tienen capacidad bactericida ^(11, 28, 45, 60). Estas moléculas son péptidos activos contra otras bacterias, son no tóxicas y reúnen los requerimientos como conservadores de alimentos. ⁽⁸⁾

Como se mencionó uno de los principales problemas de salud en el mundo provocado por la ingesta de alimentos no inocuos, son las infecciones estomacales. La diarrea provoca millones de muertes al año, la mayoría son niños de países en desarrollo. Se estima que más del 30% de la población en estos países son afectadas por estos trastornos intestinales cada año. El potencial probiótico de cepas específicas de BAL puede reducir estos problemas de salud. Las cepas probióticas pueden mantener la integridad de la mucosa intestinal y permiten un balance de electrolitos que ayudan en el tratamiento y prevención de sufrir diarrea. ⁽²²⁾

2.5.2 Género *Lactobacillus* ⁽⁸⁾

Este género es dividido en tres grupos: homofermentativos obligados, heterofermentativos facultativos y heterofermentativos obligados. Los Lactobacilos son bacilos Gram (+), encontrados en lugares ricos en contenido de carbohidratos disponibles.

Se localizan en una gran variedad de habitats tales como membranas mucosas de humanos y animales (cavidad oral, intestino y vagina), en plantas y material de origen vegetal, en estiércol, aguas residuales y en alimentos fermentados o deteriorados. Los lactobacilos son obicuos en la dieta y son encontrados en el tracto gastrointestinal de recién nacidos. En humanos sanos los lactobacilos están presentes normalmente en la cavidad oral (10^3 - 10^4 UFC/g), en el íleo (10^3 - 10^7 UFC/g) y en el colon (10^4 - 10^8 UFC/g) y son los microorganismos predominantes en la vagina.

Algunas cepas de *Lactobacillus* producen bacteriocinas, por lo cual han sido utilizadas como conservadores de alimentos, como es el caso de productos lácteos fermentados. Las bacteriocinas pueden ser incorporadas como cultivos iniciadores o adjuntos.

Datos bibliográficos soportan la hipótesis de que la ingestión de *Lactobacillus* no es peligrosa y que la lactobacilemia inducida por alimentos, particularmente productos fermentados, es extremadamente rara y que ocurre únicamente en pacientes predispuestos. En ensayos clínicos se ha administrado a bebés prematuros, infantes, niños, ancianos, personas con enfermedad de Crohn o enfermos de diarrea y personas VIH-positivas y no se han reportado efectos secundarios.

Los lactobacilos tienen una resistencia natural alta a la bacitracina, cefoxitina, ciprofloxacina, ácido fusídico, kanamicina, gentamicina, metronidazol, nitrofurantoína, norfloxacin, estreptomina, sulfadiazina, teicoplanina, trimetoprima/sulfametoxazol, y vancomicina ^(8, 37). Existen diversos estudios acerca de la transferencia de genes de resistencia de estos antibióticos a otras bacterias, pero no son sistemáticos. ⁽⁸⁾

2.5.3 Género *Lactococcus*

Se reconocen tres subespecies de *Lactococcus lactis*. *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* se han utilizado como cultivos iniciadores en alimentos fermentados, especialmente en la industria láctea pero también se han logrado aislar de diferentes medio ambientes (Tabla 4). La tercera subespecie es *L. lactis* subsp. *hordniae*, ésta se encontró que está asociada a insectos. ⁽⁵⁸⁾

Por otro lado, en el trabajo realizado por García, B., et. al, se encontró que la cepa de *Lactococcus lactis* UQ2 aislada de un queso fresco Mexicano, produce la bacteriocina nisina A, y demostró su capacidad bactericida contra la biopelícula de *Listeria monocytogenes*. Además, demostraron que la combinación de los dos principales compuestos inhibitorios que produce *L. lactis* (ácido láctico y nisina) son más eficientes contra *L. monocytogenes*, que cada uno por sí solo. ⁽²⁸⁾

Tabla 4. Especies de *Lactococcus* identificadas en diferentes ambientes

Microorganismo	Ambiente del que fue aislado	Referencia
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Productos lácteos, suelo, superficies de plantas y tracto gastrointestinal de un pescado	Pu, Z.Y. (2002), Itoi, S. (2008)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Productos lácteos	Pu, Z.Y. (2002)
<i>L. raffinolactis</i>	leche agria o cortada, cultivos de zanahorias, tracto gastrointestinal de gansos y bovinos	Pu, Z.Y. (2002)
<i>L. garvieae</i>	de vacas que sufren mastitis, suelos de cultivos, patógeno en peces y acuacultura	Pu, Z.Y. (2002)
<i>L. plantarum</i>	chícharos congelados	Pu, Z.Y. (2002)
<i>L. piscium</i>	patógeno en peces y acuacultura	Pu, Z.Y. (2002)

2.5.4 Género *Streptococcus*.⁽¹⁷⁾

Streptococcus thermophilus es aislado frecuentemente de productos lácteos pero algunas cepas han sido aisladas recientemente de muestras vegetales en Bulgaria. El género *Streptococcus* es identificado como bacterias anaerobias, aerotolerantes, catalasa-negativa y gram positivas, morfología celular ovoide, con crecimiento en cadenas lineales, incapaces de crecer a 10°C, a pH 9.6 o en 6.5% de NaCl⁽¹⁷⁾ pero a pesar de esta última característica no se puede descartar la existencia de alguna cepa halófila que pudiera encontrarse en el queso Cotija.

S. thermophilus es una bacteria ácido láctica termofílica, ampliamente utilizada en la manufactura de productos lácteos y puede ser considerado como la segunda cepa más importante en la industria láctea después de *L. lactis*. Es tradicionalmente utilizado en la producción de yogurt y en muchos quesos como Emmental, Gruyère, Parmesano, Grana, Mozarella y Cheddar.

Se ha podido identificar la presencia *S. thermophilus* por medio de métodos moleculares en algunas muestras del queso artesanal italiano “*Toma piemontese*”, aunque con menor frecuencia con respecto al número de muestras analizadas ⁽²⁵⁾. También se ha encontrado en leche cruda de vaca, recolectada en una región al norte de Italia en verano e invierno, junto con otros cocos en un 94% de frecuencia con respecto al número de muestras analizadas. ⁽²⁷⁾

Recientemente se han aislado y caracterizado cepas de *S. macedonicus* aisladas de quesos Italianos elaborados con leche cruda de vaca y se demostró una clara distinción tecnológica con *S. thermophilus*. ⁽³⁸⁾

En la producción de queso *S. thermophilus* se utiliza solo o en combinación con diversos lactobacilos y cultivos mesofílicos. Su papel en la fermentación de la leche es la rápida conversión de lactosa a ácido láctico, lo que provoca un decremento en el pH. Varias cepas de *S. thermophilus* sintetizan exopolisacáridos que contribuyen a la deseable textura viscosa y propiedades reológicas de productos de leche fermentada, yogurt en particular.

Diversos estudios han caracterizado bacteriocinas producidas por *S. thermophilus* que son activos contra *Pediococcus acidilactici*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*.

Se ha encontrado que la combinación de especies probióticas con *S. thermophilus* tienen efectos positivos en tratamientos de diarrea en niños pequeños, en tratamientos de enterocolitis en bebés prematuros y en tratamientos de intestino inflamado.

S. thermophilus, *S. salivarius* y *S. vestibularis* forman parte del grupo de estreptococos *Viridians*. *S. thermophilus* es la única especie de de estos estreptococos que se encuentran en productos lácteos, además es una especie GRAS.

S. salivarius y *S. vestibularis* han sido aisladas de la cavidad oral humana y son comúnmente asociados con infecciones humanas. Se han reportado diversos casos de meningitis, endocarditis y bacteriemia debidos a estos dos estreptococos orales. Recientemente, los genomas de tres cepas de *S. thermophilus* fueron secuenciadas. Una característica sorprendente de estos genomas es la ausencia o inactivación de los genes de virulencia característicos de los estreptococos patógenos. Esto avala la condición segura de su uso en productos lácteos.

2.6 BAL presentes en el queso Cotija (Antecedentes del grupo de trabajo)

Las BAL que se mencionarán a continuación fueron aisladas del Queso Cotija por métodos de microbiología tradicional. Se identificaron taxonómicamente 14 cepas con el sistema API 50CHL, 11 correspondientes a *Enterococcus faecium*, una a *Lactobacillus plantarum*, otra a *Lactobacillus brevis* y una *Lactobacillus paracasei* (10, 16).

Por medio de la secuenciación de la región V3 del gene 16S rARN se logró identificar a las BAL: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Vagococcus sp.*, y *Marinilactibacillus sp.* ⁽⁶³⁾.

Los métodos microbiológicos tradicionales no fueron adecuados para aislar todas las BAL presentes en el queso Cotija, debido a que generalmente la población bacteriana tiene requerimientos nutricionales y condiciones de crecimiento similares a sus condiciones ambientales, las cuales son difíciles de recrear en un laboratorio. La naturaleza compleja de la matriz del alimento dificultó el aislamiento de los microorganismos debido a que éstos se encuentran protegidos en una red proteínica, aunado a la gran cantidad de grasa que tiene el queso Cotija.

Los microorganismos que se encontraban en bajas concentraciones no se pudieron aislar fácilmente ya que la metodología de microbiología tradicional que se siguió, requiere de realizar varias diluciones hasta de 10^{-6} para obtener colonias puras por lo que sólo se pudieron aislar aquellos microorganismos que se

encontraban en altas concentraciones, los cuales correspondieron a los pertenecientes al género *Enterococcus*. También se pudieron aislar bacterias del género *Lactobacillus* pero con menor frecuencia, respecto al número de muestras analizadas. ⁽¹⁰⁾

En investigaciones recientes del grupo de trabajo, se encontró que las cepas mencionadas presentan actividad antibacteriana ⁽¹⁶⁾, lo cual resulta ser un avance importante ya que esto repercute directamente en la inocuidad del queso Cotija.

2.7 TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS

Existen un amplio rango de técnicas que se emplean para identificar y caracterizar la microflora del queso o de cualquier alimento. Se dividen en tres grupos: 1) métodos que dependen de la cultivación seguida por una caracterización fenotípica; 2) métodos que dependen de cultivación seguida de una caracterización molecular y 3) métodos que dependen únicamente de la caracterización molecular.

Los métodos que dependen de la microbiología clásica, requiere del cultivo de la muestra en un medio selectivo seguido de la caracterización de las colonias que resulten aisladas. Solo las colonias que pueden crecer bajo las condiciones selectivas utilizadas pueden ser monitoreadas y caracterizadas fenotípicamente.

La aplicación de técnicas moleculares para la caracterización de microorganismos resuelve muchos de los problemas asociados con su caracterización fenotípica. ⁽⁷⁾

A continuación, se describe una de las técnicas moleculares más empleada para la identificación de microorganismos en un alimento, la “Reacción en Cadena de la Polimerasa”.

2.7.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), es un procedimiento efectivo para generar grandes cantidades de una secuencia específica de ADN *in vitro*. Esta amplificación que llega a ser mayor a un billón de veces, se logra mediante un proceso cíclico de reacciones enzimáticas. Los requerimientos esenciales para esta técnica son:

- a) Un ADN de doble cadena que actúe como molde o templado.
- b) Dos oligonucleótidos sintéticos como iniciadores de la síntesis, que deben ser complementarios a regiones en cadenas opuestas de ADN. La hibridación será en regiones que flanquean al ADN de interés y con los extremos 3' orientados hacia el centro.
- c) Una enzima con actividad de ADN polimerasa termoestable que resista temperaturas mayores a 95 °C, como la polimerasa **Taq** de *Thermus aquaticus* (*Platinum*) o de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*).
- d) Los cuatro dNTPs en un buffer de concentración y pH óptimo para la ADN polimerasa.

El procedimiento cíclico del PCR es en tres pasos: la **desnaturalización** del ADN molde es el primero. La muestra se somete a calentamiento hasta llegar alrededor de 95 °C por espacio de algunos minutos, para romper los puentes de hidrógeno que le confieren al ADN su estructura de doble hélice ⁽⁶⁾. Para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra esta temperatura debe mantenerse unos minutos. Si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los cebadores y una posterior extensión. ⁽¹⁹⁾

El segundo paso, implica la **hibridación** de los oligonucleótidos iniciadores con sus regiones específicas en el templado, un oligonucleótido en cada una de las cadenas. Esta reacción se lleva a cabo a una temperatura menor (50-62 °C) que depende de la secuencia de los iniciadores ^(6, 62). La temperatura de fusión o

annealing (T_m , “melting temperature”) depende de varios factores y es relativamente específica para cada cebador. La longitud de los cebadores y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación ⁽¹⁹⁾.

El tercer paso es la **extensión** del ADN complementario, la temperatura se aumenta hasta alrededor de 75 °C que al ser la óptima para la función catalítica de la ADN polimerasa *Taq*, permite la síntesis de las cadenas del ADN a partir del extremo –OH 3' de los oligonucleótidos y procede en dirección 5' a 3'. ⁽⁶⁾

El producto de PCR es comúnmente llamado “amplicón”. Los amplicones pueden ser cargados en un gel de agarosa y son separados por electroforesis de acuerdo a su tamaño. Para determinar el peso molecular son incluidos estándares de ADN de diversos tamaños, para estimar el correspondiente al amplicón (nes) presentes en muestras positivas y control positivo. El gel de agarosa es teñido con bromuro de etidio, el cual se une a la doble cadena de ADN y fluoresce por la excitación con luz UV permitiendo la visualización del ADN. El tamaño amplicón es la distancia entre el cebador directo y el de reversa. Por ejemplo, si los cebadores de avance y reversa se unen al gene blanco X en las posiciones 850 y 1000 pb, respectivamente, entonces el amplicón que se espera es de 150 pb para cualquier muestra que contenga al gene X. ⁽⁴²⁾

La estrategia de la PCR es que los productos amplificados sirven a su vez como la plantilla en el ciclo siguiente. Lo interesante de la técnica de PCR es que cada ciclo dobla el contenido del ADN blanco original. En la práctica 20-30 ciclos funcionan generalmente para amplificar la secuencia blanco, incrementando la cantidad de 10^6 a 10^9 veces (*Figura 5*).

El método de PCR es una herramienta de gran alcance. Es fácil de realizar, extremadamente sensible, específica y eficiente. No sólo una gran cantidad de ADN amplificado puede ser producido en algunas horas, sino que además

solamente algunas moléculas del ADN blanco necesitan estar presentes en la muestra para comenzar la reacción.

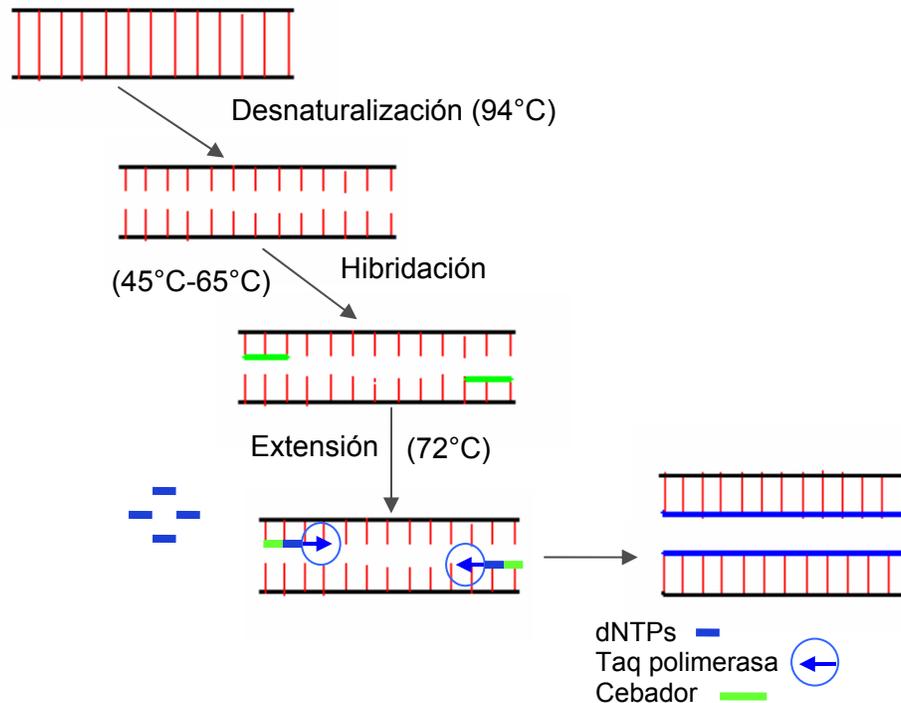


Figura 5. Diagrama de un ciclo de la PCR ⁽⁴²⁾

En diversos estudios realizados se afirma que el método de la PCR puede detectar concentraciones de microorganismos $\geq 10^4$ UFC/g, esto establece su límite de detección* ^(12, 43).

El método de la PCR de forma especie-específica, se ha utilizado con éxito para la detección y caracterización de microorganismos en alimentos. Recientemente se ha empleado en la tipificación de la microbiota de diversos alimentos elaborados de forma artesanal, entre ellos diferentes tipos de quesos. Varias investigaciones se han enfocado especialmente en la búsqueda de BAL en estos alimentos, debido a su importancia tecnológica y a los beneficios que otorgan a la salud humana. ^(4, 12, 14, 25, 27, 38, 40, 44, 58)

* El límite de detección se define como la mínima cantidad de un analito, que puede ser detectado en un análisis y se determina con el empleo de muestras que contienen una concentración conocida de dicho analito

2.7.2 Optimización de las condiciones de reacción para detección de microorganismos

▀ Secuencia del cebador y concentración

La secuencia de los cebadores necesitan ser exactos o muy cercanos al blanco deseado para ser amplificado, y no deben tener homología a ninguna otra secuencia en la mezcla ⁽³⁵⁾. El diseño del cebador es un punto crítico para obtener resultados por PCR inequívocos y fácilmente interpretables. ⁽³⁹⁾ Para determinar si los cebadores son exactos se realiza un estudio *in silico* con ayuda de un BLAST.

El BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos. El algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema. El parámetro E es conocido como *valor e* (*e-value* o *espectancia*) de corte y nos permite definir que la semejanza encontrada no fue producto del azar, porque indica que la probabilidad de que se hubieran alineado al azar es muy baja. Cuanto menor sea el valor de E más significativo es un alineamiento. ⁽¹⁾

Para prevenir hibridación entre los cebadores, éstos no deben ser complementarios. Esta precaución es crítica en el extremo 3', en donde la complementariedad de hasta una base puede llevar a la formación de un *dímero* ⁽³⁵⁾. Los dímeros de los cebadores consisten en fragmentos de doble cadena cuya longitud es muy próxima a la de la suma de los cebadores y se producen cuando un cebador es extendido a continuación del otro. ⁽¹⁹⁾

A la hora de elegir unos cebadores para amplificar un determinado fragmento de ADN hay una serie de reglas a seguir:

- a) La **longitud de cada uno de los cebadores** debe estar comprendida entre 18 y 24 bases ya que se ha comprobado que cebadores de mayor longitud (30-35 bases) no aumentan el rendimiento y los cebadores cortos carecen de suficiente especificidad.
- b) Ambos cebadores deben tener una **T_m** similar (como mucho la diferencia entre ambas temperatura debe ser de 5°C).
- c) La **relación bases púricas:bases pirimídicas** debe ser 1:1 (o como mucho 40-60%).
- d) La **secuencia de los cebadores** debe comenzar y terminar con 1-2 bases púricas.

Los excesos iniciales de los cebadores con respecto al templado es tal que su concentración es constante. Para la mayoría de las aplicaciones de PCR los dos cebadores deben tener la misma concentración. La concentración final de cada cebador debe ser entre 0.1- 0.5 μ M. Las desventajas de un exceso de cebadores pueden repercutir en la formación de dímeros. ⁽⁴²⁾

▀ Temperatura de alineamiento

La temperatura de alineamiento (T_m) es aquella a la cual la mitad de los cebadores se hibridan con la secuencia blanco, es regularmente calculada para oligonucleótidos de 20 bases de longitud o menores con la siguiente ecuación:

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

en donde A, T, G y C son el número de estas bases en el oligonucleótido. Pueden realizarse cálculos más elaborados en donde se contempla la concentración de sales o el número de nucleótidos, pero esta simple regla satisface muchas aplicaciones. ⁽³⁵⁾

No obstante, cada cebador exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de alineación específica ya que si la temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa ⁽¹⁹⁾. En general con temperaturas relativamente altas de alineamiento, se disminuye grandemente la posibilidad de obtención de algún “falso positivo”. ⁽³⁹⁾

➤ Buffer de reacción

Los buffer de PCR que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris y MgCl₂. El MgCl₂ es el componente que más influye en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que los iones Mg²⁺ son necesarios para la actividad de la *Taq polimerasa*, es decir, actúan como cofactores de la polimerasa.

La concentración óptima de MgCl₂ está en torno a 1.5 mM si se emplean concentraciones de 200 mM de cada uno de los dNTPs. No obstante, a veces es necesario probar con diferentes cantidades de Mg²⁺ ya que un exceso del mismo origina una acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente hace que disminuya el rendimiento de la amplificación. ⁽¹⁹⁾

➤ Concentración de Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)

Se recomienda que sean utilizados 200 μM de cada desoxinucleótido. En un volumen de reacción de 25 μl con esta concentración de dNTPs se sintetizarían entre 6-6.5 μg de ADN. La concentración de dNTPs y de MgCl₂ van relacionadas, ya que el Mg²⁺ se une a los dNTPs con lo que concentraciones elevadas de dNTPs inhibirían la reacción, al no tener la *Taq polimerasa* suficiente Mg²⁺ como para incorporar dNTPs. Es muy importante que las concentraciones de todos los desoxinucleótidos sean equivalentes para prevenir la incorporación de errores ^(19, 35).

➤ ADN polimerasa termoestable

Las cantidades óptimas de *Taq polimerasa* (como las marcas comerciales *Pfu* y *platinum*) necesarias para la síntesis de ADN están alrededor de 2 unidades en 25 μ l de volumen final de reacción. La actividad de este enzima se ve influenciada por la concentración de dNTPs, de Mg^{2+} y de algunos iones monovalentes de manera que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad. ⁽¹⁹⁾

➤ ADN molde o templado

Es el ADN del cual queremos copiar un determinado fragmento, es por tanto, el ADN que la *Taq polimerasa* utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas polinucleotídicas. La cantidad de ADN necesaria para la PCR depende de varios factores:

Calidad del ADN: Cuando se trabaja con ADN cuya calidad es óptima no suele haber problemas en la amplificación y cantidades del mismo por encima e incluso por debajo de los 5 ng rinden buenos resultados. El problema aparece cuando la calidad del ADN obtenido no es la idónea, bien porque esté degradado o bien porque dicho ADN vaya ligado a una serie de contaminantes que pueden inhibir la actividad de la polimerasa. Si el ADN está degradado, el que obtengamos o no resultado en la amplificación va a depender de que el fragmento a amplificar haya sido dañado o no. En el caso en el que tengamos ADN sin degradar pero unido a una serie de contaminantes habría que intentar diluir al máximo la muestra para disminuir dichos contaminantes, pero siempre dentro de un rango de ADN que no esté por debajo del límite de sensibilidad de la PCR. ⁽¹⁹⁾

➤ Adyuvantes de la PCR

Son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad de la PCR. Aunque algunos autores han recomendado el uso del DMSO y del glicerol, el adyuvante más extendido y utilizado es el BSA. A concentraciones por encima de 0.8 μ g/ μ l el BSA incrementa la eficiencia de la PCR ya actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la *Taq polimerasa*. ⁽¹⁹⁾

2.7.3 Problemas de la PCR en la detección de microorganismos ⁽⁴²⁾

La PCR no puede distinguir células vivas, muertas o dañadas. Sin embargo ofrece una alternativa para identificar las células que aún se encuentran viables en un producto, esto es mediante el uso del ARN como templado. En contraste con el ADN, el ARN tiene una vida media corta en la célula bacteriana. Esto se ha considerado en el uso del ARN como templado, para diagnosticar por PCR células viables remanentes en una muestra, por lo que esto pudo ser logrado por medio de la conversión del ARN a su copia complementaria de ADNc con la transcriptasa inversa retroviral. El ADNc puede servir como templado en un PCR estándar. Este procedimiento es referido como PCR transcriptasa-inversa.

3. HIPÓTESIS

- ◇ Si el queso Cotija se elabora con prácticas higiénicas de manufactura, entonces se obtendrá una cuenta baja de microorganismos coliformes y hongos en dichos productos.
- ◇ Si se seleccionan los cebadores específicos para la detección de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, entonces se podrá detectar su presencia en el queso Cotija a través de la reacción en cadena de la polimerasa aunque se encuentren en bajas concentraciones.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos generales

- ◇ Determinar la calidad sanitaria de diez diferentes muestras de Queso Cotija, así como la cuenta microbiana presente, mediante la cuenta de microorganismos indicadores por la técnica de cuenta en placa y microfiltración.
- ◇ Detectar bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* en el Queso Cotija, de forma específica por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

4.2 Objetivos particulares

- ◇ Cuantificar microorganismos mesófilos aerobios, hongos y levaduras, mediante la técnica de cuenta en placa, así como determinar coliformes totales y fecales mediante la técnica de microfiltración.
- ◇ Seleccionar cebadores específicos para identificar a *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus*, así como las condiciones adecuadas de amplificación y corroborar su especificidad por medio de la PCR.
- ◇ Realizar la detección de *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* en diez muestras de queso Cotija Región de Origen con y sin enriquecimiento por el método de PCR.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

5.1.1 Muestras de queso Cotija

Se analizaron 10 muestras de Queso Cotija (Región de Origen), pertenecientes a la zona de Jalisco-Michoacán. Todas las muestras cuentan con el tiempo mínimo de maduración para salir a la venta (3 meses), los datos de éstas se encuentran en la *Tabla 5*.

Tabla 5. Muestras compradas en Diciembre de 2006 en la Feria del Queso Cotija, Mich.

Nº de Muestra	Lugar de elaboración
1	Rancho "El Lorenzo" Cotija/Michoacán
2	Rancho "Las Pilas"/Jalisco.
3	Rancho "El Saltrillo" Cotija/Mich.
4	Rancho "Piedra Amarilla" Jilotlán de los Dolores/Jal.
5	Rancho "La Plaza de Chávez" Lourdes/Mich.
6	Rancho "El caracol" Lourdes/Mich.
7	Rancho "La mesa del Aguacate". Quitupán/Jal
8	Rancho "La tortuga" Jalisco
9	Rancho "La Troja" Jalisco
10	Lourdes / Mich.

5.1.2 Cepas de BAL de identidad conocida

Se utilizaron las siguientes cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) puras de identidad conocida como control, así como una cápsula ingerible la cual contenía una mezcla de BAL liofilizadas. A continuación se enlistan dichas cepas:

- Lactobacillus casei* PP201*
- Streptococcus thermophilus* NCFB 859*
- Lactococcus lactis***
- Enterococcus faecalis****
- Enterococcus faecium****
- Lactobacillus paracasei****
- Cápsula: “Potent probiotic ACIDOPHILUS whit pectin”(L. *acidophilus*, L. *brevis*, L. *salivarius*, L. *helveticus*, L. *bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*)

* Cepas proporcionadas por la UAM Iztapalapa

** Cepas proporcionadas por la Dra. Carmen Wachter

*** Cepas aisladas de muestras de Queso Cotija

5.2 TOMA DE MUESTRA

5.2.1 Queso Cotija

Las muestras de queso Cotija se encontraban almacenadas en ultracongelación a -70 °C, por lo que antes de realizar las determinaciones tanto microbiológicas como para la extracción de ADN, se descongelaron en refrigeración a 4 °C durante un máximo de 18 h, como se establece en la NOM-110-SSA1-1994. Cabe destacar que las muestras correspondían a trozos de queso de aproximadamente 1 Kg cada uno.

Posteriormente se cortaron las porciones necesarias para cada estudio, con un cuchillo estéril a lo largo de la rebanada, del centro del queso hacia la corteza pero sin llegar a ella (*Figura 6*). La corteza no se tomó en cuenta debido a que usualmente ésta no es consumida.

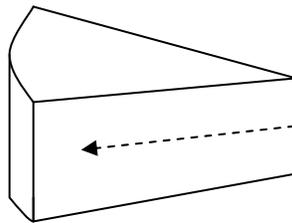


Figura 6. Esquema de la toma de muestra del queso Cotija

5.3 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO GENERAL

Como paso inicial para realizar el estudio microbiológico se preparó una serie de diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-4} con base en lo descrito en la NOM-110-SSA1-1994. ⁽⁴⁷⁾

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. En la *Fig 7* se muestra un diagrama general del análisis.

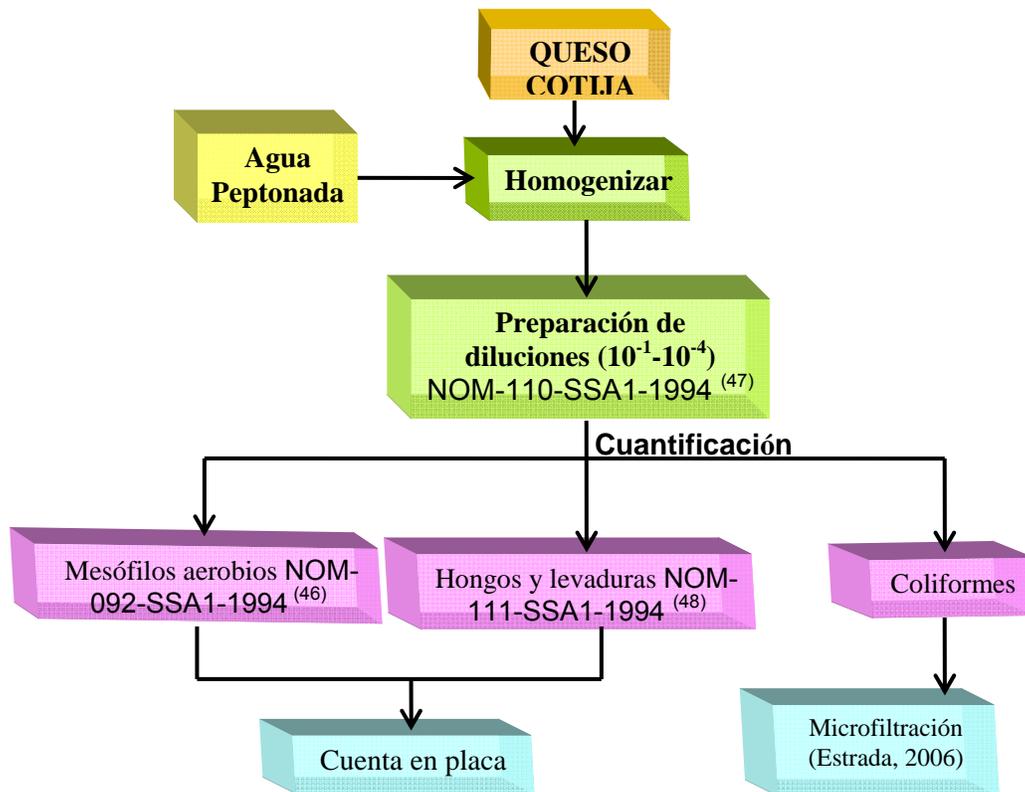


Figura 7. Diagrama general del estudio microbiológico

5.3.1 Cuenta de mesófilos aerobios, hongos y levaduras

Para realizar las determinaciones de microorganismos mesófilos aerobios, hongos y levaduras se tomaron como referencias las NOM-092-SSA1-1994 y NOM-111-SSA1-1994, respectivamente. Como variante a lo estipulado en dichas normas se empleó la técnica de siembra por extensión en superficie, la cual consistió en inocular determinado volumen de la dilución correspondiente y distribuirla con ayuda de una varilla "L" estéril, en el medio Agar Cuenta en Placa para cuantificar mesófilos aerobios y en el medio Agar Papa Dextrosa acidificado para cuantificar hongos y levaduras (la metodología detallada se encuentra en el Anexo I). La incubación se llevó a cabo en una incubadora estática (Marca: Gravity Convection, Mod. E-71) con las condiciones siguientes:

Microorganismos	T (°C)	Tiempo
Mesófilos aerobios	37°C	24h
Hongos	25°C	3-6 días
Levaduras	25°C	3-6 días

5.3.2 Cuenta de coliformes totales y fecales

Se siguió la metodología sugerida por los fabricantes del equipo y medio Millipore® pero a partir de las modificaciones establecidas en el método estandarizado para una muestra sólida (Estrada, 2006) (Anexo I), en el que se establece que se debe realizar la filtración a partir de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , entre 5 a 10 mL de la primera dilución y entre 50 y 100mL de la segunda para así garantizar la sensibilidad y efectividad del método. Posteriormente la membrana se colocó en el medio de cultivo selectivo y diferencial ColiBlue24® (Marca Millipore®) e incubó a 37 °C durante 24h.

Las colonias de *E. coli* presentan una coloración azul y las colonias de los otros coliformes presentan una coloración roja (Figura 8), si las colonias no presentan coloración, entonces las colonias se consideran negativas para este grupo. De acuerdo al protocolo se tienen que considerar las placas que presenten entre 8 a 80 colonias para obtener valores estadísticamente confiables.

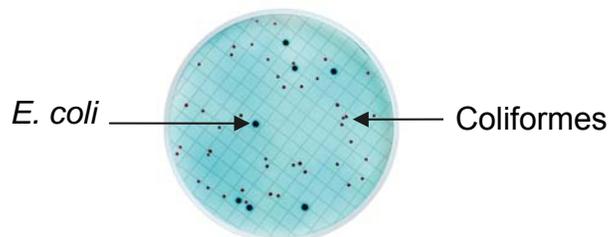


Figura 8. Medio ColiBlue24®

5.4 DETECCIÓN DE BAL POR PCR EN EL QUESO COTIJA

La metodología seguida para la detección de las BAL se divide en tres pasos:

- ◇ Selección de cebadores
- ◇ Prueba de especificidad de los cebadores
- ◇ Detección de las bacterias ácido lácticas de interés en el queso Cotija

A continuación se describe cada uno de estos pasos.

5.4.1 Selección de cebadores

La experimentación consistió en:

1. Búsqueda bibliográfica. Se realizó una búsqueda de juegos de cebadores específicos utilizados para identificar a las BAL: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*.
2. Corroboración de la especificidad reportada “in silico”, con ayuda de la base de datos NCBI y la herramienta BLAST. Se verificó que la información arrojada por la base de datos correspondiera al microorganismo de interés, con el mínimo valor de expectancia (E) y el mayor porcentaje de identidad
3. Selección de los juegos de cebadores con base a lo anterior,

5.4.2 Prueba de especificidad de los cebadores seleccionados

Esta prueba se realizó con las diferentes BAL descritas anteriormente (Sección 5.1.2). La cepa de *Streptococcus thermophilus* se inoculó en 5mL de caldo estéril MRS (Man Rogosa Sharpe), posteriormente se le adicionaron 1.5 mL de aceite mineral estéril con la finalidad de obtener un ambiente anaerobio. El resto de las cepas proporcionadas, se inocularon en 5mL de caldo APT y se incubaron con las condiciones indicadas en la *Tabla 6* para cada microorganismo (Anexo I).

Tabla 6. Condiciones de incubaciones de las cepas de BAL empleadas

Microorganismo	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Incubadora/Condición
<i>Lactobacillus casei</i> PP201	37	24	Con agitación*/ 200 rpm
<i>Streptococcus thermophilus</i> NCFB 859	42	48	Gravity Convection, Mod. E-71/ Estática
<i>Lactococcus lactis</i>	37	24	Con agitación*/ 200 rpm
<i>Enterococcus faecalis</i>	37	24	Con agitación*/ 200 rpm
<i>Enterococcus faecium</i>	37	24	Con agitación*/ 200 rpm
<i>Latobacillus paracasei</i>	37	24	Con agitación*/ 200 rpm

* Incubadora con agitación; Marca New Brunswick Scientific, Mod. INNOVA 4000

Una vez concluido el tiempo de incubación de cada cepa, se les realizó una Tinción de Gram y se observaron bajo el microscopio con el objetivo 100X con la finalidad de corroborar su pureza. Adicionalmente todas las cepas fueron conservadas a -70°C en viales con chaquiras y medio líquido, al cual se le añadió glicerol (15%) como agente criogénico.

Por otro lado a la cápsula ingerible que contenía la mezcla de BAL se le retiró la cápsula de pectina y se vació su contenido en un tubo Eppendorf de 2.0 mL. Dicho contenido se trató directamente para la extracción de ADN, el cual se describe a continuación.

5.4.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por duplicado con el Kit FAST ID[®] (Genetic ID Na, Inc.). En un principio se utilizó el método de fenol-cloroformo, pero se comprobó experimentalmente mediante una reacción de PCR tiempo real, que no existe una diferencia significativa en la calidad del ADN molde obtenido por ambos métodos. Con base en estos resultados se continuó trabajando con el método de extracción Kit FAST ID para las extracciones de ADN posteriores.

La extracción de ADN con el Kit de extracción FAST ID[®] (Genetic ID Na, Inc.), consta de tres pasos básicos que son: la lisis de la pared y membrana celular, extracción de ADN y purificación del ADN. (Anexo I).

Una vez que se obtiene el ADN se determina su pureza, para ello se realiza la lectura de la absorbancia a 260 nm y a 280 nm correspondiente al ADN y proteínas, respectivamente en un espectrofotómetro con una celda de cuarzo de volumen reducido. Con los datos obtenidos se realiza la siguiente relación para obtener el índice de pureza:

$$\text{Índice de Pureza} = \frac{\text{Abs } 260 \text{ nm}}{\text{Abs } 280 \text{ nm}}$$

El valor óptimo debe estar entre 1.5 y 2.0. Posteriormente se determina su concentración con la siguiente fórmula:

$$(A_{260\text{nm}}) (\text{Factor de conversión}) (\text{dilución}) = \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \right]$$

Por último se realizaron una serie de reacciones de amplificación con diferentes condiciones de reacción, dependiendo de los cebadores a utilizar con la finalidad de corroborar su especificidad.

5.4.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para realizar las reacciones de amplificación, se mezclaron las cantidades de reactivos necesarios (*Tabla 7*) en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL excepto el ADN molde de la cepa a probar, a esta mezcla se le denomina Master mix. Posteriormente se trasvasan 15 μ L de la mezcla y 10 μ L del ADN molde en tubos para PCR estériles (0.2 mL), es importante que la mezcla se encuentre en hielo y se debe adicionar al final, ya que la enzima ADN polimerasa utilizada *Pfu* (Fermentas®) tiene actividad exonucleasa 3'-5' que puede degradar los cebadores. Posteriormente se colocan en un Termociclador (Marca Techne, Mod. TC-312), con las condiciones correspondientes a cada par de cebadores (*Tabla 8,9 y 10*). (Anexo I, Sección 3)

Tabla 7. Concentraciones de reactivos para realizar una PCR de 25mL

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por tubo (μ L)
Buffer	10X	1X	2.5
MgSO ₄	25mM	1.5mM	1.5
dNTPs	10mM	0.2mM	0.5
Oligo 1	10 μ M	0.5 μ m	1.25
Oligo 2	10 μ M	0.5 μ m	1.25
Taq polimerasa (<i>Pfu</i>)	2.5U/ μ L	1U/reacción	0.4
ADN molde	10ng/ μ L	100ng/reacción	10
Agua			6.6

Una vez concluida la PCR se realizó una electroforesis horizontal a 85V en un gel de Agarosa al 1.5% para *Lactobacillus casei* y de 1.0% para *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis* con los productos obtenidos de la amplificación (PCR). El gel fue teñido con bromuro de etidio para facilitar su visualización con luz UV.

Tabla 8. Condición para el Termociclador (para detectar *Lactococcus lactis*)

No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	3min
35	94°C	30s
	49°C	30s
	72°C	2min
1	72°C	7min

Tabla 9. Condición para el Termociclador (para detectar *Streptococcus thermophilus*)

No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	3min
35	94°C	30s
	45°C	30s
	72°C	2min
1	72°C	7min

Tabla 10. Condiciones para el Termociclador (para *Lactobacillus casei*)

No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	3min
	45°C	45s
	72°C	2min
30	94°C	45s
	45°C	45s
	72°C	1min
1	94°C	45s
	45°C	45s
	72°C	5min

En la *Figura 9*, se muestra un esquema general de la metodología para las pruebas de especificidad de los cebadores seleccionados.

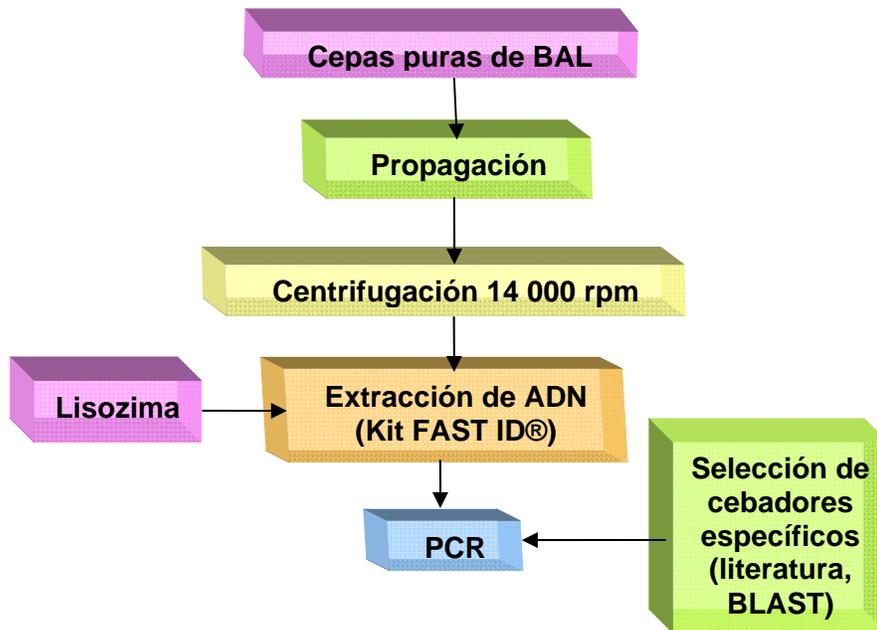


Figura 9. Diagrama de la metodología para determinar la especificidad de los cebadores seleccionados

5.4.3 Detección de *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* en el queso Cotija

Una vez comprobada la especificidad así como las condiciones ideales de reacción, se prosiguió a la detección de las bacterias ácido lácticas de interés en el queso Cotija.

En este caso se siguieron dos metodologías alternas para la extracción de ADN (Anexo I, Sección 2), una consistió en la extracción de ADN directamente de la muestra con el Kit FAST ID® (Genetic ID Na, Inc.). La otra consistió en realizar una incubación previa de la muestra con medio de cultivo líquido. Para el caso de la detección de *Lactobacillus* y *Lactococcus*, se empleó caldo APT estéril y para el caso de la detección de *Streptococcus*, se utilizó caldo MRS y aceite mineral estéril. Las condiciones de incubación se llevaron a cabo en las condiciones antes descritas para las cepas de BAL puras (Tabla 6). Posteriormente se realizó la extracción con el Kit FAST ID® (Genetic ID Na, Inc.). En ambos casos antes de la

extracción a las muestras se les realizó un tratamiento para eliminar la grasa y la matriz proteica del queso.

El enriquecimiento se realizó con la finalidad de aumentar la cantidad de las BAL de interés, y así poder facilitar su detección por medio de la técnica de PCR. En el trabajo realizado por Aymerich, et. al. (2003), se demostró que el hecho de enriquecer la muestra favorecía la detección de algunas especies de BAL por PCR. ⁽⁴⁾

Una vez obtenido el ADN de las muestras, se realizaron las reacciones de amplificación (PCR's) con las condiciones respectivas para cada microorganismo (Tabla 5,6 y 7). (Anexo I, Sección 3)

En la *Figura 10* se muestra un diagrama general para la detección de las BAL de interés en el queso Cotija.

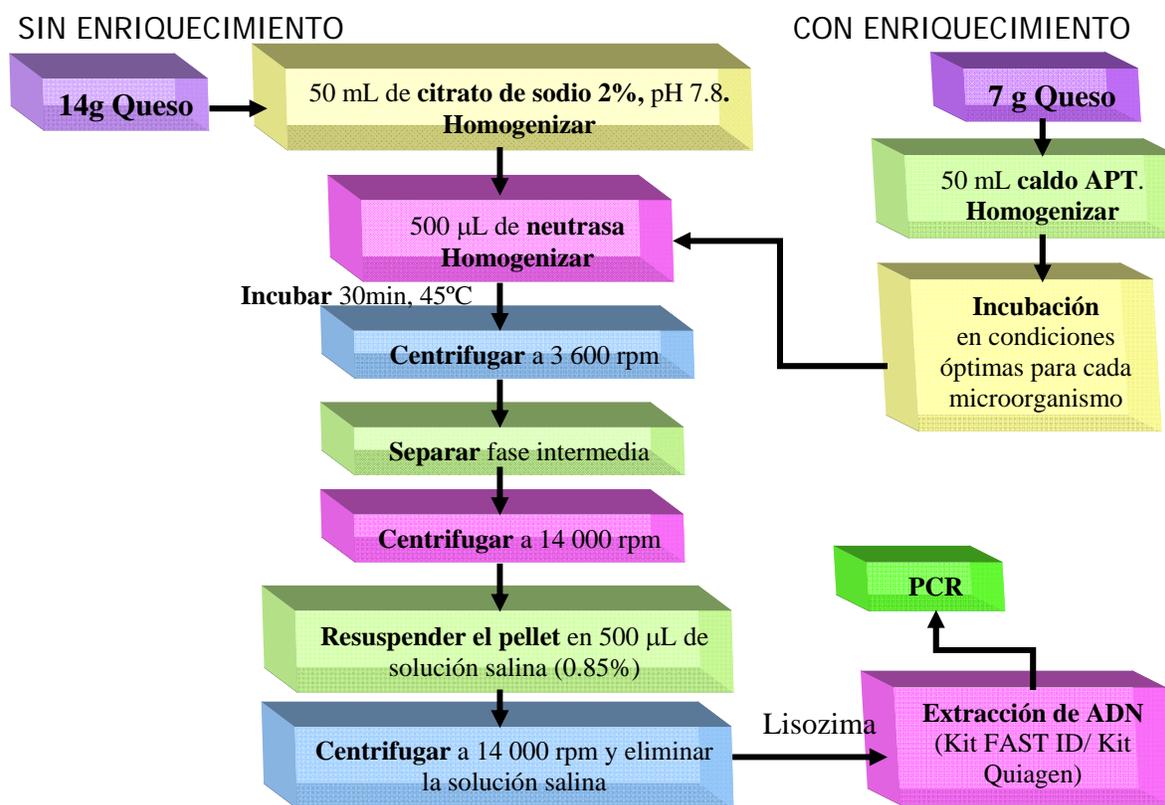


Figura 10. Diagrama de la metodología para la detección de BAL en el queso Cotija

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Estudio microbiológico general

La determinación de microorganismos indicadores puede dar indicios de malas prácticas de higiene que repercutan en la presencia de microorganismos patógenos que puedan causar daños a la salud y con esto decidir si se realiza una búsqueda específica posterior. Además este tipo de estudio nos permite conocer la carga microbiana que posee un producto, en el caso del queso Cotija poco estudiada.

A pesar de que el queso Cotija auténtico es un queso madurado éste no entra dentro de la definición establecida en la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, *Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias*, ya que en dicha norma sólo se consideran a los quesos madurados elaborados a partir de leche pasteurizada ⁽⁵⁰⁾. A pesar de esto los valores establecidos en dicha norma para el caso de hongos y levaduras, se pueden tomar como referencia. En el caso de la determinación de coliformes y *E. coli*, la técnica no es comparable con la utilizada en este trabajo. Para facilitar el análisis de resultados en la *Tabla 11* se muestra un panorama general de resultados, los datos obtenidos en cada una de las determinaciones se muestran con detalle en el Anexo II.

Tabla 11. Tabla general de resultados. Análisis microbiológico de 10 muestras de queso Cotija

Muestra	UFC/g				
	Mesófilos aerobios (24h, 35°C)	Hongos (6 días, 24°C)	Levaduras (6 días, 24°C)	Coliformes totales (24h, 35°C)	Presencia de <i>E. coli</i> (24h, 35°C)
1*	3.2 *10 ⁶	< 67	8.90*10 ³	<10	< 10
2*	4.7*10 ⁶	< 67	< 67	400	< 10
3*	5.1 *10 ⁵	< 67	< 67	< 10	< 10
4*	6.4 *10 ⁴	< 67	< 67	<10	< 10
5*	2.5 *10 ⁵	< 67	< 67	340	< 10
6	2.4 *10 ³	< 67	< 67	< 10	< 10
7	4.9*10 ⁵	< 67	2.4*10 ³	< 10	< 10
8	3.1*10 ⁵	< 67	< 67	200	< 10
9	6.9*10 ⁴	< 67	2.1*10 ⁵ (3 días, 24°C)	<10	< 10
10	1.7*10 ⁴	< 67	9.2*10 ³	< 10	< 10

* Estrada, 2009

▀ Mesófilos aerobios

La importancia de la determinación de mesófilos aerobios radica en que permite saber la carga total de microorganismos viables presentes en las diferentes muestras de queso Cotija. Con base a los resultados (*Tabla 11*) el contenido de estos microorganismos está dentro del rango de 10³ a 10⁶ UFC/g.

Cabe destacar que las muestras analizadas tienen el tiempo mínimo estipulado de maduración para salir a la venta (3 meses). En la investigación realizada por Bravo (2008), se observó que la cantidad de mesófilos aerobios en muestras de queso Cotija en el tiempo de vida cero (t_0), es decir a partir del desfajado, es de un orden de magnitud de 10⁷ UFC/g. Esta cantidad disminuye conforme aumenta el tiempo de maduración, pero se mantiene casi constante durante los primeros 3 meses de vida del queso en un rango de 10⁴-10⁶ UFC/g.

Además se observó que la cantidad de mesófilos aerobios tienen correspondencia con la cantidad de bacterias ácido lácticas (BAL) en el producto, ya que se obtuvieron valores similares. Esto podría indicar que la mayoría de los microorganismos mesófilos aerobios cuantificados son BAL.⁽¹⁰⁾

Los quesos elaborados con leche cruda contienen una concentración alta de BAL no iniciadoras en la cuajada, cuya población y crecimiento es más heterogéneo que para los quesos elaborados con leche pasteurizada ⁽²⁶⁾. Cabe recordar que en el proceso de elaboración de este producto no se agregan cultivos iniciadores, por lo que los microorganismos existentes en el Queso Cotija provienen de la leche (a la cual se incorporan microorganismos durante la ordeña) y de la sal, así como de las operaciones que se llevan a cabo manualmente y del medio ambiente.

La variación de la cantidad de los microorganismos mesófilos aerobios durante la maduración se debe a que durante ésta, ocurren cambios fisicoquímicos y bioquímicos que pueden afectar el crecimiento de los microorganismos en el queso, algunos ejemplos son: la actividad del agua, concentración de sal, potencial de oxidación-reducción, pH, temperatura de maduración y la presencia o ausencia de bacteriocinas (producidas por algunos microorganismos), entre otros.
(26)

Una interpretación adecuada de la cuenta de mesófilos aerobios en un alimento, requiere del conocimiento de la población microbiana esperada en el punto del proceso en el cual fue colectada la muestra. Si las cuentas son más altas que lo esperado, ese punto necesitará ser analizado para determinar cual fue la causa
(18).

En el caso del queso Cotija no se tiene conocimiento de la carga microbiana en cada uno de los puntos del proceso de elaboración, por lo que los resultados obtenidos aportarán información sobre la cantidad de microorganismos mesófilos aerobios presentes en el tiempo correspondiente a su comercialización. Si en un

futuro se implementara un sistema de calidad en el proceso, se sugiere realizar un análisis microbiológico general, en diferentes puntos del proceso de elaboración que se consideren críticos como: en la leche antes de utilizarla, es decir después del reposo y en el cuajo salado, ya que la etapa del salado se lleva a cabo de forma manual. (ver Fig.4, Sección 2.2.2)

➤ **Hongos y levaduras**

En las diez muestras analizadas no se encontró presencia de hongos, por lo que se reporta menos de 67 UFC/g de hongos en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado incubadas 6 días a 24 °C. La NOM-121-SSA1-1994 establece como límite máximo 500 UFC/g de hongos y levaduras. Se encontró la presencia de levaduras en cantidad variable. En seis muestras (2, 3, 4, 5, 6 y 8) se reportaron menos de 67 UFC/g de levaduras en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C, mientras que en las cuatro restantes (1, 7, 9 y 10) se encontraron cuentas que sobrepasan el límite máximo de 500 UFC/g establecido en la norma mencionada. La muestra 9 destaca por contener la mayor cantidad de levaduras (10^5 UFC/g) en el menor tiempo de incubación (3 días).

La incorporación de levaduras se puede llevar a cabo durante su elaboración (en la manipulación del producto), así como del medio ambiente. Por lo anterior este último resultado sugiere, que las condiciones ambientales del lugar en donde se elaboró cada muestra y/o las prácticas sanitarias durante la manipulación del producto son diferentes entre ellas. Estos puntos se deben tomar en cuenta para la estandarización del proceso de elaboración, ya que la variación en cantidad de este tipo de microorganismos puede repercutir en la alteración de las características sensoriales propias del producto.

► Coliformes totales y fecales

La técnica establecida en la norma de referencia (NOM-121-SSA1-1994) para la determinación de coliformes, es el método del Número más Probable (NMP). De acuerdo a los resultados obtenidos por Estrada (2006) se demostró que el método de microfiltración es más sensible, ya que con el NMP se subestima la cantidad real de coliformes. Además con esta técnica se puede determinar al mismo tiempo la presencia de *Escherichia coli* ⁽²¹⁾. En consecuencia los valores establecidos en la norma NOM-121-SSA1-1994 no son comparables con los datos obtenidos con la técnica de microfiltración empleada en este trabajo, como ya se mencionó.

El empleo de la técnica de microfiltración Millipore® no es un método validado para su uso en la determinación de coliformes y *E. coli* en alimentos, por lo que se tomó como referencia la norma venezolana COVENIN 3822:2003 ⁽⁵³⁾ para un queso fresco elaborado a partir de leche pasteurizada, en la cual utilizan un método de análisis cuyo fundamento de detección es similar al que se realizó en este trabajo para determinar coliformes y *Escherichia coli* en alimentos. En dicha norma establece para coliformes como límite mínimo 150 UFC/g y como límite máximo 1100 UFC/g; para el caso de *E. coli* se establece que se deben encontrar < 10 UFC/g. Cabe destacar que en esta norma se utiliza el método con películas secas rehidratables (Petrifilm®) y en su protocolo se utiliza el método de difusión en placa ⁽⁵²⁾.

La determinación de coliformes y *Escherichia coli* es muy importante debido a que este tipo de microorganismos son de origen intestinal, por lo que su presencia indicaría contaminación de origen fecal, con lo que se abriría la posibilidad de presencia de microorganismos patógenos del mismo origen. Con base a lo que se mencionó anteriormente y a los resultados obtenidos del análisis de las diez muestras, se puede observar en la *Tabla 11* que la cantidad de coliformes, así como la cantidad de *E. coli* están dentro del rango permitido; 150 -1100 UFC/g y <10 UFC/g respectivamente.

En el trabajo realizado por Bravo (2008) se observó una disminución mayor al 95% de la población inicial de microorganismos coliformes después de los 3 meses de vida del queso Cotija, dicha disminución la atribuye a la actividad de las BAL cuya población se mantiene en cantidad casi constante como ya se mencionó,

Los métodos rápidos aprobados a nivel Internacional por la AOAC para la detección de Coliformes y *E. coli* en productos lácteos son: (1) Placa con gel de pectina, (2) Película seca rehidratable (3M, Petrifilm®), y (3) Película seca rehidratable de alta sensibilidad. Adicionalmente, para alimentos en general los métodos aprobados son: (1) Película seca rehidratable (3M, Petrifilm®), (2) Película seca rehidratable. Cuenta rápida en placa (3M, Petrifilm®), (3) SimPlate con color indicador para Coliformes y *E. coli*, (4) Método de sustrato soportado en disco (ColiComplete®), (5) Método de Filtración en Membrana con poros hidrofóbicos y (6) Método de Filtración en Membrana con poros hidrofóbicos/MUG⁽³²⁾. Cabe destacar que los dos últimos métodos incluyen la técnica de filtración, y esta validada para ser utilizada en quesos. En este método se utiliza una membrana como el nombre del método lo dice, diseñados de un material con poros hidrofóbicos; en el protocolo se establece que se debe de filtrar un volumen de 2 mL de la dilución 10^{-1} digerida con la enzima tripsina, posteriormente se coloca la membrana en el medio sólido, una vez incubado, los resultados se reportan en NMP/g. Como se puede observar existe una gran diferencia entre este método y el empleado en este trabajo.

Por otro lado en México existen dos normas para la detección de coliformes para ser aplicadas en alimentos: (1) la NOM-112-SSA1-1994⁽⁴⁹⁾ y (2) la NOM-113-SSA1-1994⁽⁵⁰⁾; en la primera establece como método el Número más Probable y en la segunda el método de cuenta en placa.

Con base en los datos obtenidos se puede decir que la calidad sanitaria de las diez muestras analizadas de queso Cotija, es aceptable a pesar del proceso de elaboración de este producto las cuentas de coliformes, *E. coli* y hongos, se encuentran dentro del rango reportado en la literatura para quesos elaborados con leche pasteurizada. Este análisis es preliminar pero se sugiere hacer la búsqueda específica de patógenos como: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* como lo indica la norma NOM-121-SSA1-1994.

6.2 Detección de las BAL por medio de la PCR en el queso Cotija

Los métodos moleculares o independientes de cultivo, a pesar de que aportan mayor información que los tradicionales ya que mediante ellos, se pueden identificar microorganismos no-cultivables poseen limitantes como: 1) el límite de detección del método, que de acuerdo a algunas investigaciones el método es capaz de detectar $\geq 10^4$ UFC/g ^(12, 44) y 2) la falta de conocimiento taxonómico, ya que es difícil estudiar la diversidad de un grupo de microorganismos en un determinado hábitat cuando no se conoce dicha diversidad y existe la posibilidad de que géneros o especies que no han sido previamente aislados e identificados estén presentes. ⁽³⁶⁾

El interés en la búsqueda del grupo de las BAL en este producto en particular es por la función que tienen en el aseguramiento de la inocuidad de éste, debido a la producción de compuestos tales como ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido propiónico, entre otros) y bacteriocinas que disminuyen el riesgo de la presencia de bacterias patógenas.

Como se mencionó en la Sección 5.4 del diseño experimental, se siguieron tres pasos básicos para la búsqueda de las BAL elegidas en el queso Cotija. Los resultados se reportan a continuación en ese orden.

6.2.1 Selección de cebadores

Los pares de cebadores específicos seleccionados para identificar a las BAL de interés se muestran en la *Tabla 12*. El par de cebadores para identificar *Lactobacillus casei* (casei/Y2), se tomó del reporte de la investigación realizada por Ward and Timmins (1999), en la cual lograron diferenciar a *Lactobacillus casei* de *Lactobacillus paracasei* por medio de la técnica de PCR ⁽⁶¹⁾. Por otro lado, el juego de cebadores para identificar a *Lactococcus lactis* (Hist1/Hist2) y para *Streptococcus thermophilus*, se tomaron del trabajo realizado por Fortina, et. al. (2002), en la cual realizaron la búsqueda de BAL en un queso artesanal italiano, por medio de la técnica mencionada ⁽²⁵⁾. Posteriormente se compararon las secuencias de dichos cebadores en la base de datos BLAST.

En la *Figura 11* se muestra un ejemplo del BLAST realizado con el cebador específico para *Lactobacillus casei*. Con este procedimiento se observa que el valor E es el más bajo (0.042) para el microorganismo de interés, además de que el porcentaje de identidad corresponde al 100%. Estas consideraciones se realizaron con cada uno de los cebadores a probar y se seleccionaron los reportados en la *Tabla 12*.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ348442.1	Lactobacillus casei strain LC-1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	40.1	40.1	100%	0.042	100%
AB008212.1	Lactobacillus zeae gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: YIT	40.1	40.1	100%	0.042	100%
EF468100.1	Lactobacillus casei strain DSM 20011 16S ribosomal RNA gene, part	40.1	40.1	100%	0.042	100%
EF442282.1	Lactobacillus casei isolate BFT1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	40.1	40.1	100%	0.042	100%
AR289058.1	Lactobacillus casei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM	40.1	40.1	100%	0.042	100%
AB289057.1	Lactobacillus casei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM	40.1	40.1	100%	0.042	100%
DQ401824.1	Uncultured Lactobacillus sp. clone wa07 JD33 049 16S ribosomal R	40.1	40.1	100%	0.042	100%
DQ401823.1	Uncultured Lactobacillus sp. clone wh05 JD24 044 16S ribosomal R	40.1	40.1	100%	0.042	100%
AF429500.1	Lactobacillus zeae ATCC 393 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	40.1	40.1	100%	0.042	100%
AY773945.1	Lactobacillus casei strain BCRC10697 16S ribosomal RNA gene, con	40.1	40.1	100%	0.042	100%
AF469172.1	Lactobacillus casei strain ATCC 393 16S ribosomal RNA gene, parti	40.1	40.1	100%	0.042	100%
AY196978.1	Lactobacillus casei subsp. casei ATCC 393 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.042	100%
M23928.1	L.casei small subunit ribosomal RNA	40.1	40.1	100%	0.042	100%
D86518.1	Lactobacillus casei gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.042	100%
XM_001247349.1	Coccidioides immitis RS proteasome component (CIMG_01121) par	34.2	34.2	85%	2.6	100%
EU776902.1	Uncultured bacterium clone ML_aaj26e04 16S ribosomal RNA gene,	32.2	32.2	80%	10	100%
XM_001097666.1	PREDICTED: Macaca mulatta similar to zinc finger protein 218 (LOC	32.2	32.2	80%	10	100%
AL007004.16	Mouse DNA sequence from clone RP23_134H12 on chromosome 4 C	32.2	50.5	00%	10	100%
AL671090.9	Mouse DNA sequence from clone RP23-154A10 on chromosome 4 C	32.2	32.2	80%	10	100%
D16551.1	Lactobacillus casei gene for 16S rRNA	32.2	32.2	100%	10	90%
EU944750.1	Zea mays clone 225148 mRNA sequence	30.2	30.2	95%	40	94%
AM992697.1	Uncultured Methanothermococcus sp. partial 16S rRNA gene, clone	30.2	30.2	75%	40	100%
CP000948.1	Escherichia coli str. K12 substr. DH10B, complete genome	30.2	30.2	75%	40	100%
XM_001804952.1	Phaeosphaeria nodcrum SN15 hypothetical protein partial mRNA	30.2	30.2	75%	40	100%

Figura 11. National Center for Biotechnology, GenBank DNA database. Resultado de la homología de secuencias (para *Lactobacillus casei*)

Tabla 12. Cebadores específicos seleccionados

Nombre	Microorganismo	Secuencia (5'→3')	Gen-Blanco	pb	Valor (E)	Tm (°C)	Referencia
casei (f)	<i>Lactobacillus casei</i>	TGCACTG AGATTCG ACTTAA	16S ARNr	290	0.042	56	Ward and Timmins (1999)
Y2 (r)	<i>Lactobacillus</i>	CCCCTG CTGCCTC CCGTAGG AGT				75	
St1 (f)	<i>Streptococcus thermophilus</i>	CACTATG CTCAGAA TACA	lac Z	900	0.53	50	Fortina, et. al. (2002)
St2 (r)		CGAACAG CATTGAT GTTA				50	
Hist1 (f)	<i>Lactococcus lactis</i>	CTTCGTT ATGATTT TACA	Operón de biosinte- sis de histidina	933	0.64	46	
Hist2 (r)		CAATATC AACAAAT CCAT				46	

* pb; pares de bases; f: cebador directo; r: cebador de reversa

La selección de los cebadores específicos es un paso de gran importancia, debido a que de ello dependen los resultados inequívocos de la técnica de PCR ⁽³⁹⁾. La base de datos NCBI y la herramienta BLAST fueron de gran ayuda en el criterio de selección de cebadores específicos para identificar BAL de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* pero es importante corroborar su especificidad experimentalmente con cepas de identidad conocida de las BAL respectivas para cada par de cebadores.

6.2.2 Pruebas de especificidad de los cebadores seleccionados

Como primer paso para corroborar la pureza de las cepas de las BAL proporcionadas, se les realizó una tinción de Gram y se observaron bajo el microscopio con el objetivo 100X. Las observaciones respectivas para cada microorganismo se muestran en la *Tabla 13*.

Tabla 13. Morfología microscópica de las bacterias ácido lácticas empleadas

Microorganismo	Observaciones (microscopio, 100X)	Gram
<i>Lactobacillus casei</i> PP201*	Bacilos cortos morados	+
<i>Streptococcus thermophilus</i> NCFB 859*	Cocos, agrupados en estreptococos, morados	+
<i>Lactobacillus paracasei</i> ***	Bacilos cortos morados	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ***	Cocos morados	+
<i>Enterococcus faecium</i> ***	Cocos morados	+
<i>Lactococcus lactis</i> CW**	Cocos morados	+

* Cepas proporcionadas por la UAM Iztapalapa

** Cepas proporcionadas por la Dra. Carmen Wachter

*** Cepas aisladas del Queso Cotija

Una vez verificada la pureza de los microorganismos control, se extrajo su ADN. La extracción es un punto clave para lograr un ADN molde de buena calidad para realizar la PCR, ya que muchas veces éste puede ser dañado en este paso. Debido a que las BAL son bacterias G(+), el tratamiento de lisis de la célula es un poco más agresivo que en el caso de la lisis de células G(-). La calidad del ADN obtenido se evaluó como se mencionó, con la medición de la absorbancia a 260nm y 280nm y se determinó su concentración (Anexo II). Con el ADN obtenido se realizaron las reacciones de amplificación (PCR) con los cebadores seleccionados (*Tabla 12*) y las condiciones óptimas (*Tablas. 8-10*).

En una PCR se considera positiva una muestra si un amplicón es producido con el tamaño esperado para los cebadores utilizados, de lo contrario se considera negativo. A reserva de secuenciar la banda obtenida, para determinar la especificidad se debe probar la PCR contra varias y diferentes cepas de bacterias cercanamente o distantemente relacionadas en género y/o especie. ⁽⁴²⁾

En las Figuras: 12, 13- 14 y 15 se pueden observar los amplicones con el tamaño esperado (ver Tabla 12) para la identificación de *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei*, respectivamente. Se puede asegurar que los cebadores seleccionados son específicos para las bacterias de interés por que no se observan amplicones del mismo tamaño con las BAL de otros géneros y/o especies analizadas.

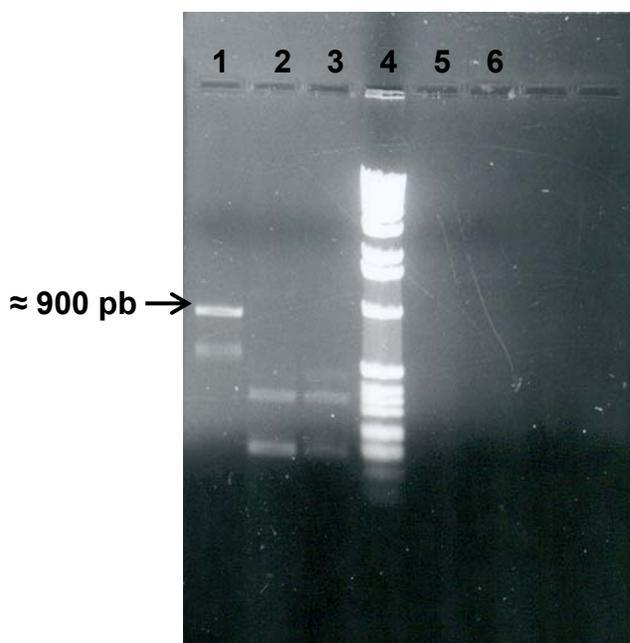


Figura 12. Detección de *Lactococcus lactis* por PCR (Hist1/Hist2); Línea 1: *Lactococcus lactis*, Línea 2: *Lactobacillus paracasei*, Línea 3: *Enterococcus faecalis*, Línea 4: Marcador 1 kb (Invitrogen), Línea 5: *Lactobacillus casei*, Línea 6: Blanco de reacción.

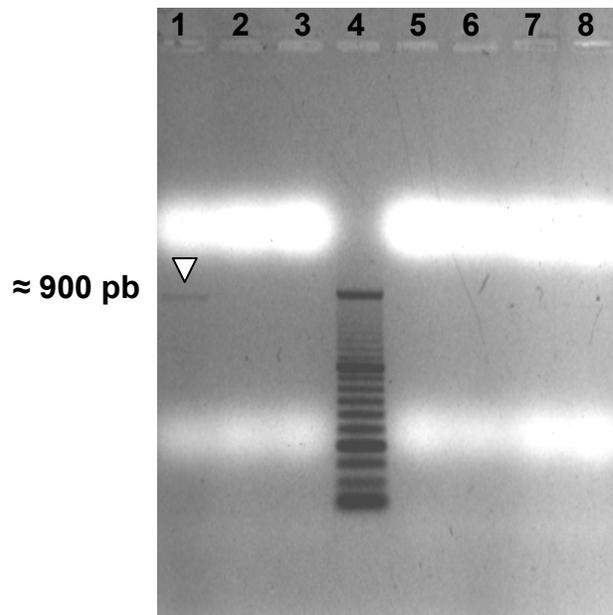


Figura 13. Detección de *Streptococcus thermophilus* por PCR (St1/St2); Línea 1: *Streptococcus thermophilus*, Línea 2: *Enterococcus faecium*, Línea 3: *Enterococcus faecalis*, Línea 4: Marcador 50 pb (Fermentas), Línea 5: *Lactobacillus casei*, Línea 6: *Lactobacillus pentosus*, Línea 7: *Lactococcus lactis*. Línea 8: Blanco de reacción.

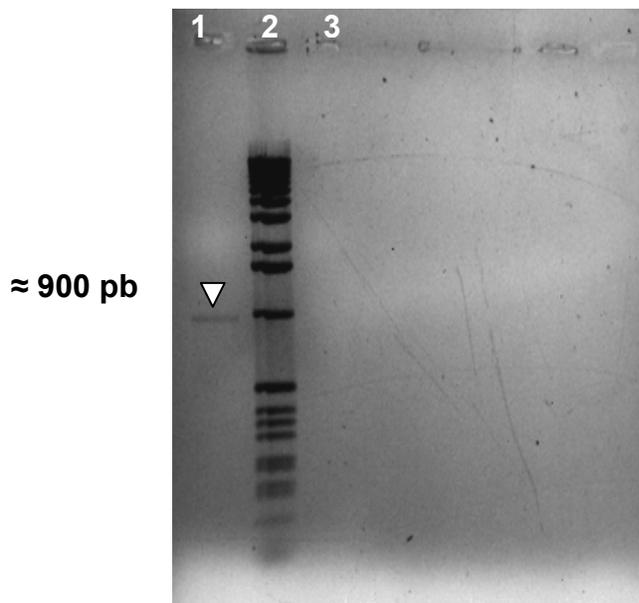


Figura 14. Detección de *Streptococcus thermophilus* por PCR (St1/St2); Línea 1: *Streptococcus thermophilus*, Línea 2: Marcador 1 kb (Invitrogen), Línea 3: Blanco de reacción.

En la *Figura 15* también se puede observar que los cebadores amplifican con una bacteria del mismo género (*Lactobacillus*), aunque con menor especificidad ya que se observa una banda más tenue de ~100 pb correspondiente a *Lactobacillus paracasei*. Por lo anterior se decidió probar con el liofilizado de la mezcla de diferentes especies de *Lactobacillus* con la finalidad de saber si amplificaba para otras especies del mismo género. Con dicha mezcla se observó una banda de ~400 pb (*Figura 16*) y con estos resultados se comprobó que el par de cebadores casei/Y2 además de ser específico para *Lactobacillus casei*, es capaz de diferenciar otras especies de *Lactobacillus*, este resultado es debido a que probablemente se este amplificando una región común entre estas especies.

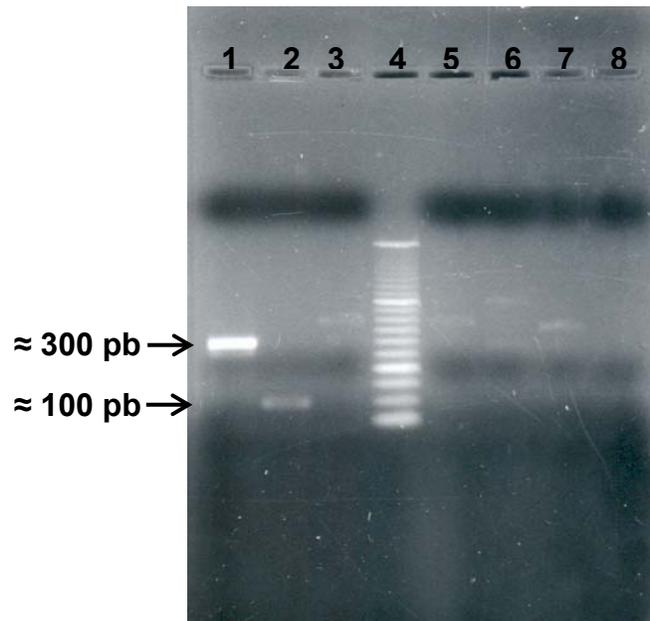


Figura 15. Detección de *Lactobacillus casei* por PCR (*casei/Y2*); Línea 1: *Lactobacillus casei*, Línea 2: *Lactobacillus paracasei*, Línea 3: *Enterococcus faecium*, Línea 4: Marcador 50 pb (*Fermentas*), Línea 5: *Enterococcus faecalis*, Línea 6: *Streptococcus thermophilus*, Línea 7: *Lactococcus lactis*, Línea 8: Blanco de reacción.

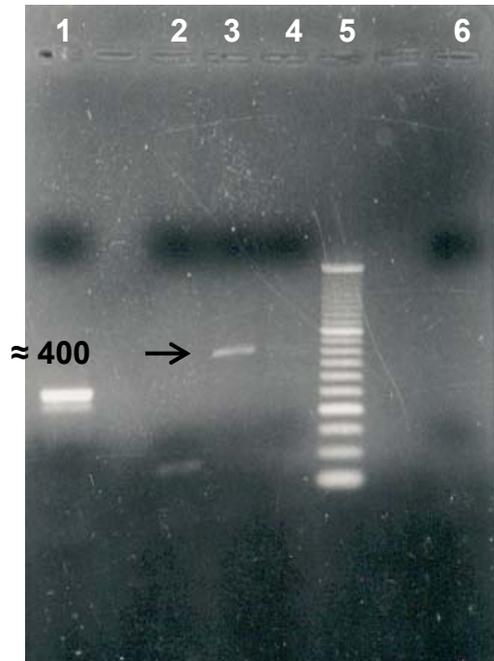


Figura 16. Detección de otras especies de *Lactobacillus* por PCR (*casei*/Y2); Línea 1: *Lactobacillus casei*, Línea 2: *Lactobacillus paracasei*, Línea 3: Mezcla de BAL, Línea 4: *Enterococcus faecalis*, Línea 5: Marcador 50 pb (Fermentas), Línea 6: Blanco de reacción.

Estas pruebas son importantes debido a que al corroborar la especificidad de los cebadores seleccionados, tenemos la certeza de que con ellos se podrán identificar las bacterias de interés en las muestras de queso Cotija.

6.2.3 Detección de *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* en el queso Cotija

En la investigación realizada por Zúñiga (2009) acerca de la diversidad microbiana en el queso Cotija, mediante el método molecular PCR-DGGE en donde se utilizó el gene blanco 16S ARNr, se observó en la huella génica obtenida una microbiota muy compleja ⁽⁶³⁾. Para lograr identificar los microorganismos correspondientes al grupo de las BAL, se planteó en este trabajo cerrar la búsqueda de forma específica por género-especie mediante la PCR. Como se mencionó se seleccionaron tres géneros representativos: *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, ya que además de ser ampliamente utilizados en la industria láctea, se ha encontrado su presencia en un queso artesanal elaborado con leche cruda de vaca. ⁽²⁵⁾

Como se mencionó en la metodología se siguieron dos métodos alternos, uno en donde se realizó la extracción del ADN de la muestra (queso Cotija) directamente, y otra en donde se le realizó un enriquecimiento para aumentar la población de las BAL, y así la probabilidad de detectar los microorganismos de interés sea mayor. Las extracciones de ADN se realizaron por duplicado, las concentraciones respectivas se reportan en el Anexo II, pero únicamente se utilizó una réplica de cada muestra para la PCR.

Para facilitar la observación de alguna posible diferencia entre una muestra sin enriquecimiento (SE) y otra con enriquecimiento (CE), se colocaron en el gel de agarosa en este orden para cada una de las diez muestras de queso Cotija (Q1, Q2, ..., Q10). Además se colocó un control positivo (+) de la BAL de interés, para poder comparar el tamaño del amplicón esperado (*Figura 17*).

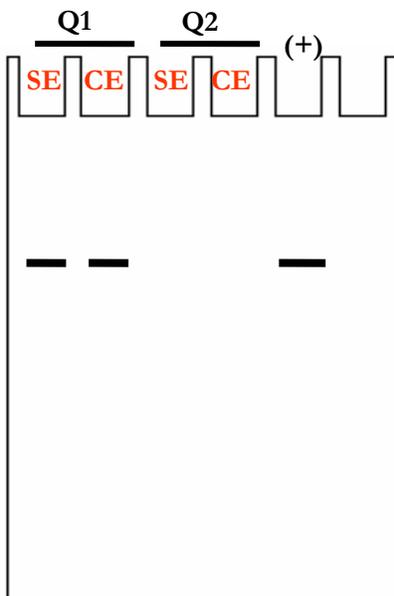


Figura 17. Esquema de colocación de las muestras en el gel de agarosa

Las Figuras 18 y 19 corresponden a los geles de agarosa con los productos obtenidos de la PCR para la búsqueda de *Lactococcus lactis* (Hist1/Hist2). Se puede observar la presencia de *Lactococcus lactis* (amplicón de ~900 pb), en tres muestras (Q6, Q8 y Q9), ambas correspondientes al ADN extraído de las muestras directamente, es decir sin enriquecimiento (SE). Un punto importante que se puede observar es que no se observó alguna amplificación con las muestras CE, esto puede ser debido a que la concentración de *Lactococcus lactis*, se encontraba por debajo del límite de detección del método ($<10^4$ UFC/g), ya que en el paso de enriquecimiento se tomó menor cantidad de muestra para la extracción de ADN, por lo que su concentración se vio diluida. Además el medio de cultivo tal vez no cubrió los requerimientos nutricionales para que éste creciera si es que se encontraba viable.

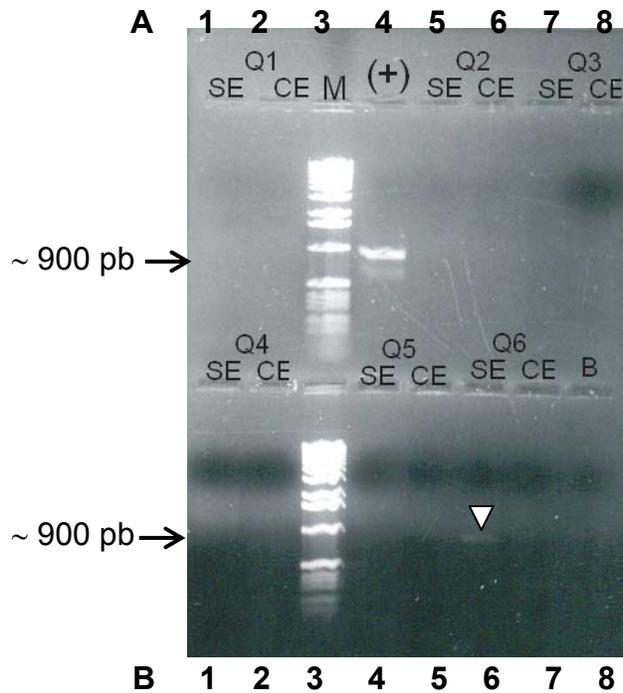


Figura 18. Detección de *Lactococcus lactis* en seis muestras de queso Cotija sin enriquecimiento (SE) y con enriquecimiento (CE); Línea 1A-2A: Q1, Línea 3A: Marcador 1 Kb (Invitrogen), Línea 4A: *Lactococcus lactis*, Línea 5A-6A: Q2, Línea 7A-8A: Q3, Línea 1B-2B: Q4, Línea 3B: Marcador 1 Kb (Invitrogen), Línea 4B-5B: Q5, Línea 6B-7B: Q6, Línea 8B: Blanco de reacción.

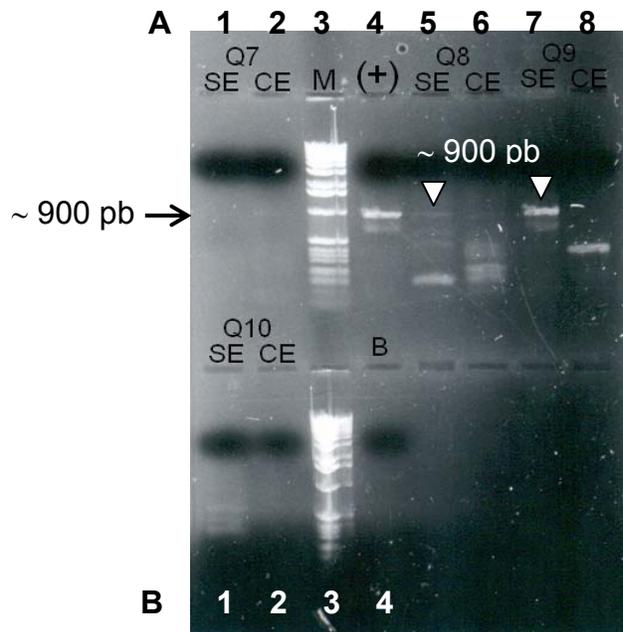


Figura 19. Detección de *Lactococcus lactis* en cuatro muestras de queso Cotija sin enriquecimiento (SE) y con enriquecimiento (CE); Línea 1A-2A: Q7, Línea 3A: Marcador 1 Kb (Invitrogen), Línea 4A: *Lactococcus lactis*, Línea 5A-6A: Q8, Línea 7A-8A: Q9, Línea 1B-2B: Q10, Línea 3B: Marcador 1 Kb (Invitrogen), Línea 4B: Blanco de reacción.

Para la detección de las bacterias del género *Lactobacillus* se utilizaron los cebadores casei/Y2, como se había mencionado. En las Figuras 20, 21 y 22, se observa el patrón de bandas obtenidas de la amplificación. Se detectó la presencia de *Lactobacillus casei* en tres muestras (Q1, Q2 y Q6), esto es por que se observa el amplicón de ~300 pb; *Lactobacillus paracasei* también se detectó en tres muestras (Q2, Q8 Y Q9), ya que se observa el amplicón de ~100 pb. Un resultado importante fue que en las muestras Q2-Q10 se detectó otra especie de *Lactobacillus* (amplicón de ~ 400 pb).

En este caso se puede observar que los resultados con las muestras SE y las muestras CE para los quesos Q2, Q3, Q5-Q10, son muy similares, ya que los amplicones obtenidos en ambos experimentos tienen la misma intensidad. En la muestra Q1 CE se observa una disminución en la intensidad del amplicón y en la muestra Q4 CE no se observa amplificación alguna. Estas últimas observaciones sugieren que la concentración de *Lactobacillus* disminuyó al enriquecer las muestras, por lo que se afectó la eficiencia de la amplificación.

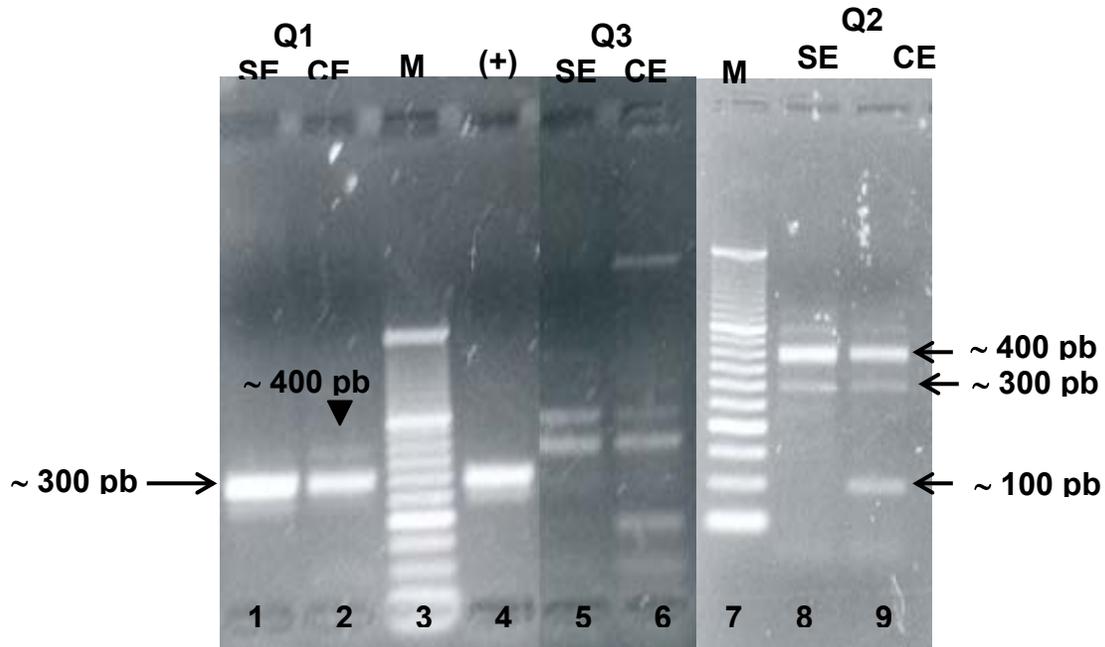


Figura 20. Detección de diferentes especies de *Lactobacillus* en tres muestras de queso Cotija sin enriquecimiento (SE) y con enriquecimiento (CE); Línea 1-2: Q1, Línea 3: Marcador 50 pb (Fermentas), Línea 4: *Lactobacillus casei*, Línea 5-6: Q3, Línea 7: Marcador 50 pb (Fermentas), Línea 8-9: Q2

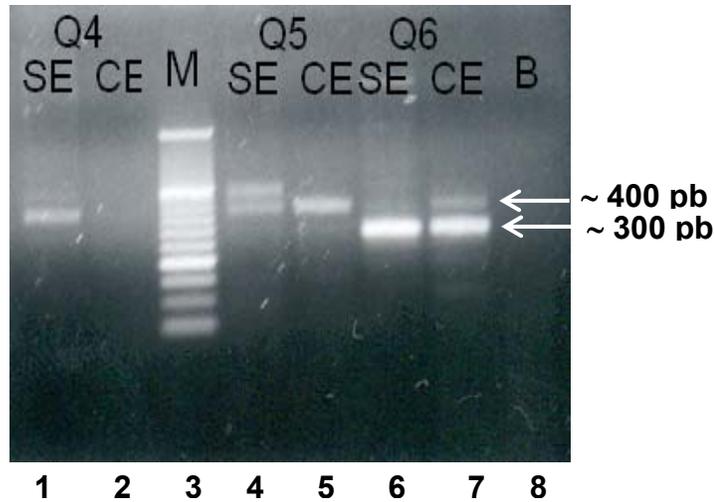


Figura 21. Detección de diferentes especies de *Lactobacillus* en tres muestras de queso Cotija sin enriquecimiento (SE) y con enriquecimiento (CE); Línea 1-2: Q4, Línea 3: Marcador 50 pb (Fermentas), Línea 4-5: Q5, Línea 6-7: Q6, Línea 8: Blanco de reacción.

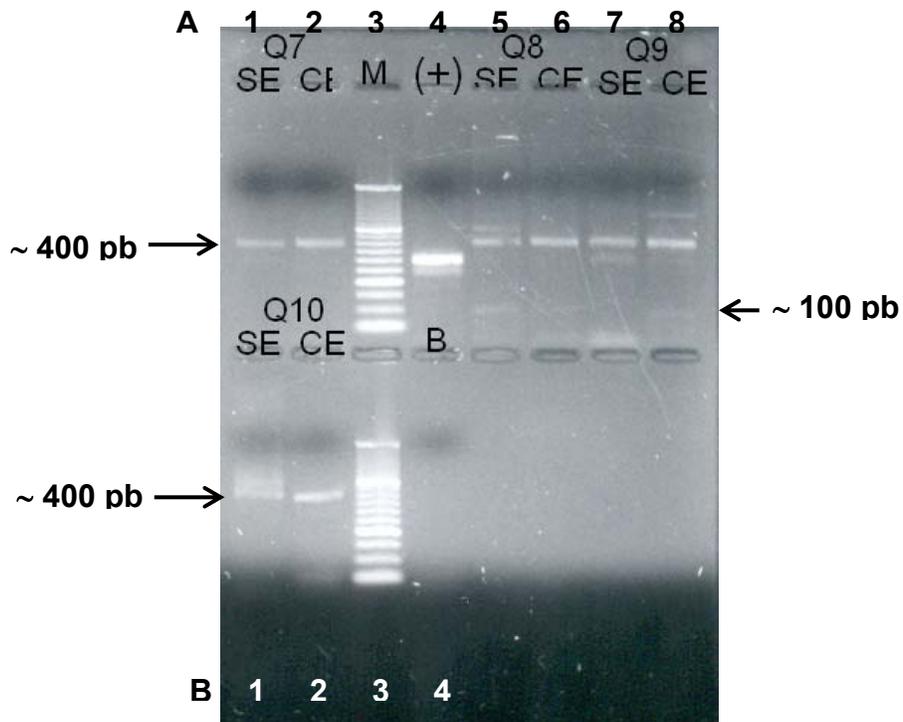


Figura 22. Detección de diferentes especies de *Lactobacillus* en cuatro muestras de queso Cotija sin enriquecimiento (SE) y con enriquecimiento (CE); Línea 1A-2A: Q7, Línea 3A: Marcador 50 pb (Fermentas), Línea 4A: *Lactobacillus casei*, Línea 5A-6A: Q8, Línea 7A-8A: Q9, Línea 1B-2B: Q10, Línea 3B: Marcador 50 pb (Fermentas), Línea 4B: Blanco de reacción.

Por último se buscó la presencia de *Streptococcus thermophilus*. Como se puede observar en las Figuras 23 y 24, no se observa la banda esperada de ~900 pb, esto sugiere que, si es que este microorganismo está presente en el queso, estaría por debajo del límite de detección de la técnica de PCR ($\leq 10^4$ UFC/g).

Se puede observar una banda de menor tamaño (~800 pb) en siete muestras sin enriquecimiento SE (Q1-Q6 y Q10) por lo que se decidió investigar la identidad del microorganismo al cual correspondía ese amplicón. Para lograrlo, se purificó el amplicón del gel de agarosa, con ayuda del “High Pure PCR Product Purification Kit”. Posteriormente se realizó una PCR para obtener mayor número de copias. Una vez corroborado en un gel de agarosa que se había obtenido una única banda, se mandó a secuenciar el producto de PCR.

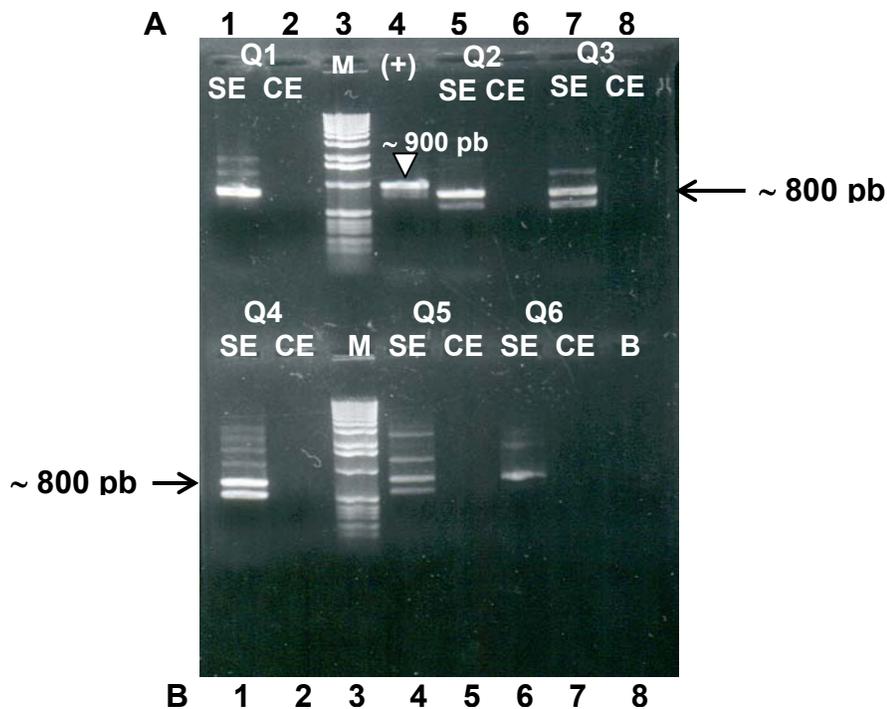


Figura 23. Detección de *Streptococcus thermophilus* en seis muestras de queso Cotija sin enriquecimiento (SE) y con enriquecimiento (CE); Línea 1A-2A: Q1, Línea 3A: Marcador 1 Kb (Invitrogen), Línea 4A: *Streptococcus thermophilus*, Línea 5A-6A: Q2, Línea 7A-8A: Q3, Línea 1B-2B: Q4, Línea 3B: Marcador 1 Kb (Invitrogen), Línea 4B-5B: Q5, Línea 6B-7B: Q6, Línea 8B: Blanco de reacción.

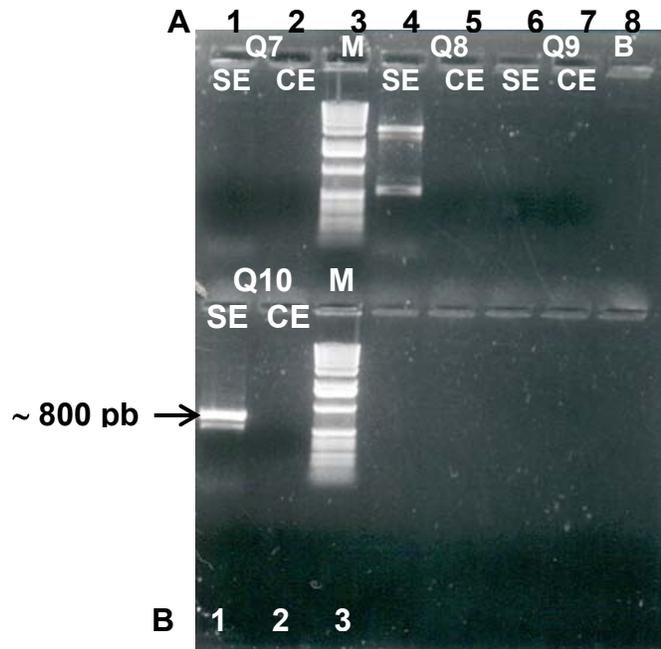


Figura 24. Detección de *Streptococcus thermophilus* en cuatro muestras de queso Cotija sin enriquecimiento (SE) y con enriquecimiento (CE); Línea 1A-2A: Q7, Línea 3A: Marcador 1 Kb (Invitrogen), Línea 4A-5A: Q8, Línea 6A-7A: Q9, Línea 8A: Blanco de reacción, Línea 1B-2B: Q10, Línea 3B: Marcador 1 Kb (Invitrogen)

La secuencia que se obtuvo correspondió al gen *cadA* de *Enterococcus faecium* (No. de acceso AY527733.1), esto fue con un 88% de identidad y un valor E de 3×10^{-139} (Figura 25). Este porcentaje de identidad es un valor bajo para asegurar que se trata de dicho microorganismo pero fue el único resultado que arrojó el BLAST. Este resultado no es del todo inesperado debido a que anteriormente se había detectado la presencia de este género como población predominante en el queso Cotija ⁽¹⁰⁾. El gen *cadA* es el gen responsable de la resistencia al ión Cadmio y se encuentra exclusivamente en bacterias Gram (+) ⁽⁵⁴⁾.

Con lo anterior en la *Tabla 14* se muestra de manera general, la frecuencia con la que se detectaron los microorganismos de interés en las diez muestras de queso Cotija. Se puede observar que de las bacterias ácido lácticas buscadas, las bacterias del género *Lactobacillus* se encontraron en una frecuencia del 100% de las muestras, el género *Enterococcus* en un 70% y *Lactococcus lactis* en el 30% de las muestras.

(a)

```
TTTTCTTTTTGCTCGTCTATAATACATGATTTGTCTTCCGGCATGACATTCGCAATTACT
TCATCTATTCCTAATTGTTTAGCCACTGCTTTTCCCGTCATTTCTGAGTCACCAGTGAT
TACTGTAGTGTGTATGCCTTGTTTTTTGAAATACTCAATCGTTTCTTTTGCATGCTCACT
AGGAAAGTCCATCAGGGCAATAAGGCCTACAACATTTTCCTCTTCTGATACGTATACG
ACTGTCTTACCTTCTGAAGACCATTTCATCATTTAGGCGAATGTATTTATCTGCAACATC
TTCAAAGAAGTAGGCTTTCCTATACGATATTTTTTACCTTTGTAATCTCCTGTCAATCC
TTTACCAATTTGATTTTCTACTTCCATATCTAGTTTATTTTTTTGTTCAAATTTTCTTAGA
ATAGCATC
```

(b)

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY527733.1	Enterococcus faecium cation efflux facilitator (czcD), ArsR/SmtB-like	503	503	100%	3e-139	88%	

Figura 25. (a) Secuencia obtenida, (b) Resultado de la homología de secuencia (BLAST)

Tabla 14. Detección de bacterias ácido lácticas en el queso Cotija

Región de procedencia	Mich.	Jal.	Mich.	Jal.	Mich.	Mich.	Jal.	Jal.	Jal.	Mich.
Microorganismo	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10
<i>Lactobacillus casei</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Lactobacillus spp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium (gen cadA)</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+

Mich.; Michoacán, Jal.; Jalisco, (+) Señal positiva, (-) Señal negativa

Es importante recordar que el hecho de que una muestra presente señal negativa (-) es decir que no se observó el amplicón esperado, no significa necesariamente la ausencia de esos microorganismos en dichas muestras ya que se debe considerar el límite de detección de la técnica (PCR). Se puede inferir que las BAL que dieron señal positiva estarían en una concentración $\geq 10^4$ UFC/g en las muestras y que por el contrario aquellas que dieron señal negativa se encuentran por debajo del límite de detección. (12, 44)

Todas las muestras provienen de la Región de Origen, cinco de ellas de Michoacán (Q1, Q3, Q5, Q6 y Q10) y cinco de Jalisco (Q2, Q4, Q7, Q8 y Q9). Es importante destacar que las muestra Q5, Q6 y Q10 provienen de Cotija, Mich.

En la *Tabla 11* se puede observar que en la muestra Q6 se logró detectar la presencia de *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis* a diferencia de las muestras Q5 y Q10 que provienen del mismo municipio. Las únicas muestras en las que no se detectó la presencia de *Enterococcus faecium* pertenecen a la región de Jalisco (Q7, Q8 y Q9). Únicamente en una muestra de la región de Michoacán se detectó

la presencia de *Lactococcus lactis* (Q6), las otras dos muestras en las que se detectó a este microorganismo pertenecen a Jalisco (Q8 y Q9). De las tres muestras (Q1, Q2 y Q6) en las que se detectó a *Lactobacillus casei* solo una corresponde a la región de Jalisco (Q2) y ésta es la única muestra en la que se detectó la presencia de *Lactobacillus paracasei*.

En el estudio realizado por Zúñiga (2009) no se logró diferenciar una muestra de queso tipo Cotija de muestras auténticas por su población bacteriana y sugiere una diferenciación por individuos ⁽⁶³⁾. En el presente trabajo se compararon únicamente muestras auténticas y se puede observar un comportamiento variable entre las diferentes muestras en cuanto a los individuos de BAL buscadas. Con base en estos resultados se puede decir que no existe una relación entre los individuos de BAL detectadas con respecto a la región de procedencia de dichas muestras.

El hecho de encontrar cepas como *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis* en el queso Cotija, reportadas como probióticas le da un valor agregado al producto. Además de que en las reglas de uso únicamente se permite la adición de cultivos microbianos con el fin de reforzar la inocuidad del producto ⁽²⁾ y es ahí en donde las BAL juegan un papel muy importante, debido a la producción de compuestos antimicrobianos (ácidos orgánicos y bacteriocinas) que ya se han mencionado.

Se ha observado que algunas cepas de los géneros encontrados (*Lactobacillus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus faecium*) producen bacteriocinas ^(8, 28, 54, 44). Estas moléculas son proteínas activas contra otras bacterias, son no tóxicas y reúnen los requerimientos como preservativos de alimentos ⁽⁸⁾. Como se mencionó, actualmente en el grupo de trabajo se han realizado estudios acerca de este tema con cepas de BAL aisladas del queso Cotija y se ha encontrado hasta ahora que las cepas de *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus brevis* tienen actividad antibacteriana. ⁽¹⁶⁾

El efecto de la actividad antibacteriana de las BAL en este producto se puede relacionar con la baja cuenta de microorganismos coliformes y *E. coli* detectadas en las diez muestras analizadas como ya se mencionó.

El género *Enterococcus* a diferencia de la mayoría de las bacterias ácido lácticas, no son consideradas GRAS y su detección en agua es empleada como indicador de contaminación fecal. El uso de enterococos en quesos es altamente controversial ya que por un lado, tienen una influencia positiva en la maduración y por el otro se consideran como patógenos emergentes en humanos. Pero esto puede ser debido a la diferencia entre cepas.

Los enterococos contribuyen en la maduración y desarrollo de aroma en quesos tales como Cheddar, Feta, Water-buffalo, Mozzarella, Cebreiro, Venado e Hispanico, esto es debido a sus actividades proteolíticas, esterolíticas y a la producción de diacetilo por el metabolismo del citrato⁽⁵⁵⁾. *E. faecalis* y *E. faecium* son las especies mas frecuentemente aisladas de productos fermentados artesanales^(4, 25,55) y de leche cruda de vaca⁽²⁷⁾.

7. CONCLUSIONES

- 1) A pesar del proceso de elaboración artesanal del queso Cotija, la población de microorganismos coliformes y *E. coli* detectados fue baja, por lo que la calidad sanitaria de las diez muestras analizadas es aceptable.
- 2) La cuenta de bacterias mesófilas fue alta en los quesos debido a las características del proceso de elaboración.
- 3) La variabilidad de la población de levaduras se atribuye a la falta de estandarización del proceso de elaboración del queso Cotija, así como a las prácticas sanitarias que lleven a cabo sus productores.
- 4) El método de extracción de ADN empleado permitió la obtención de un ADN de buena calidad para realizar las reacciones de amplificación.
- 5) La búsqueda específica género-especie de BAL en el queso Cotija por medio de la técnica de PCR arroja resultados confiables.
- 6) El par de cebadores utilizados para detectar a *Lactobacillus casei* (*casei*/Y2) además de ser específico para este microorganismo es capaz de detectar otras especies del género *Lactobacillus*.
- 7) En algunos casos el enriquecimiento de las muestras diluyó la concentración de *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus faecium* por debajo del límite de detección de la técnica de PCR, lo que afectó su amplificación.
- 8) El género *Lactobacillus* está presente en el 100% de las muestras analizadas de queso Cotija, en el 30% se detectó la presencia del género *Lactococcus*, en el 70% la presencia de *Enterococcus faecium* y una ausencia del género *Streptococcus* en todas las muestras.
- 9) No se pudo establecer la relación entre los individuos detectados de la población de BAL con respecto a la región geográfica de procedencia de las muestras.

8. PERSPECTIVAS

- ◇ Realizar la determinación específica de los microorganismos patógenos *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* como lo indica la NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.

- ◇ No se descarta la posibilidad de que el enriquecimiento de las muestras haya favorecido el crecimiento de otros géneros de BAL a los buscados en este trabajo, por lo que se sugiere realizar la búsqueda específica de otros géneros y/o especies de BAL por medio de la técnica de PCR en las muestras de queso Cotija con y sin enriquecimiento.

9. ANEXO I

METODOLOGÍA

(Correspondiente a la Sección 5. Diseño experimental)

1. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO GENERAL

1.1 Materiales y equipo

El material que se muestra a continuación, es el requerido para analizar una muestra.

1.1.1 Determinación de mesófilos aerobios, hongos y levaduras

- Autoclave (Marca: Yamato, Mod. SM300)
- Campana de flujo laminar (Marca: Industrias Alder, S.A. de C.V.)
- Balanza digital (Marca: Ohaus 600g, Mod. Scout™ Pro)
- Homogenizador Stomacher
- Incubadora estática a 37°C (Marca: Gravity Convection, Mod. E-71)
- Cuchillo estéril
- Espátula estéril
- Probeta de 50 mL estéril
- 3 matraces de 250 mL, cada uno con 100 mL de agua peptonada estéril (Sección 1.2.1), uno rotulado como dilución 10^{-1} , otro como dilución 10^{-2} A y otro como dilución 10^{-2} B
- 2 matraces de 500 mL, cada uno con 250 mL de agua peptonada estéril, rotulados como dilución 10^{-3} (A y B)
- 2 tubos de ensayo de 20 mL, cada uno con 10 mL de agua peptonada estéril, rotulados como dilución 10^{-4} (A y B)
- 1 Bolsa para homogenizar (Stomacher)
- Micropipeta de 5000 μ L con sus respectivas puntas estériles
- Micropipeta de 1000 μ L con sus respectivas puntas estériles
- Micropipeta de 200 μ L con sus respectivas puntas estériles
- 14 placas con medio Agar Cuenta en Placa estéril (Sección 1.2.2 de este apartado). Para la determinación de microorganismos mesófilos aerobios.
- 14 placas con medio Agar Papa Dextrosa Acidificado estéril (Sección 1.2.3 de este apartado). Para la determinación de hongos y levaduras.

- Varillas desechables en “L”
- 2 agitadores magnéticos estériles
- Parrilla de agitación
- Alcohol al 70%
- Algodón y toallas de papel

1.1.2 Determinación de coliformes y E. coli

- Equipo de acero para microfiltración Millipore®, el cual consta de:
 - Vaso de acero estéril
 - Soporte para vaso
 - Pinzas pato para fijar el vaso
 - 8 membranas de 0.45 µm
 - Pinzas para tomar la membrana
 - 8 cajas petri con cojín absorbente
 - 8 ampolletas con medio ColiBlue 24®
 - Soporte universal
- Matraz Kitasato (500 mL)
- Manguera látex para matraz Kitasato
- Pinzas para matraz
- Tapón de hule
- Alcohol 70% para limpieza del equipo y superficies

Nota: El material indicado como estéril, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

1.2 Reactivos

1.2.1 Agua peptonada

COMPOSICIÓN

Ingredientes	Cantidades
Peptona	1.0 g
NaCl	8.5 g
Agua destilada	1 L

PREPARACIÓN

Se disuelven los ingredientes en el volumen de agua indicado. Posteriormente se esteriliza en autoclave 15 min. a 121°C.

1.2.2 Agar Cuenta en Placa (Agar peptona de caseína-glucoasa-extracto de levadura)

COMPOSICIÓN

Ingredientes	Cantidades (g/L)
Peptona de caseína	5.0
Extracto de levadura	2.5 g
D (+)-glucosa	1.0
Agar-agar	14.0

PREPARACIÓN

Se disuelven 23.5 g en 1L de agua destilada. Posteriormente se esteriliza en autoclave 15 min. a 121°C.

1.2.3 Agar Papa Dextrosa acidificado (PDA)

COMPOSICIÓN

Ingredientes	Cantidades (g/L)
Infusión de papa (preparada a partir de 200g de papa)	4.0
D (+)-glucosa	20.0
Agar-agar	15.0

PREPARACIÓN

Disolver 39 g en 1L de agua destilada y esterilizar en autoclave 15 min. a 121°C. Acidificar a pH 3.5, para lo cual se adiciona una solución estéril de ácido tartárico al 10% a razón de 14 mL/L. Posteriormente se esteriliza en autoclave 15 min. a 121°C. Es importante no fundir de nuevo.

1.3 Metodología

1.3.1 Determinación de mesófilos aerobios, hongos y levaduras

Todo el procedimiento que se menciona a continuación, se realiza en la campana de flujo laminar. En la Figura 26 se muestra un diagrama general de la metodología seguida.

- A. Con ayuda de un cuchillo estéril cortar un trozo de la muestra de queso Cotija (Sección 5.2.1), y pesar 10g en una balanza analítica, directamente en la bolsa para Stomacher.
- B. Añadir 100mL de Agua Peptonada, correspondiente a la dilución 10^{-1} y homogenizar en el Stomacher, 2min con agitación fuerte.
- C. Vaciar esta mezcla en el matraz rotulado como dilución 10^{-1} y agitar en la parrilla de agitación, con ayuda del agitador magnético.
- D. Agregar una alícuota de 1mL de la dilución 10^{-1} a dos de las placas con los medios Agar Cuenta en Placa y a dos con el medio Agar Papa Dextrosa, rotuladas como dilución 10^{-1} A y 10^{-1} B.
- E. Extender la alícuota en la superficie del agar con una varilla en "L" (Figura 25).



Figura 25. Siembra por extensión en superficie ⁽³²⁾

- F. Añadir a cada uno de los matraces correspondientes a la dilución 10^{-2} A y B, una alícuota de 10mL de la dilución 10^{-1} con una micropipeta de 5000 μ L.

- G. Agitar en la parrilla de agitación con ayuda de un agitador magnético cada uno de los matraces anteriores.
- H. Agregar una alícuota de 0.15mL de la dilución 10^{-2} A, a dos de las placas con los medios Agar cuenta en placa y a dos con el medio Agar Papa Dextrosa, rotuladas como dilución 10^{-2} A. Hacer lo mismo con el matraz de la dilución 10^{-2} B. Conservar en refrigeración ambos matraces de esta dilución para la determinación de coliformes.
- I. Extender la alícuota en la superficie del agar con una varilla en "L".
- J. Añadir a cada uno de los matraces correspondientes a la dilución 10^{-3} A, una alícuota de 25mL de la dilución 10^{-2} A con ayuda de una probeta. Repetir el procedimiento con la serie B.
- K. Agitar en la parrilla de agitación con ayuda de un agitador magnético cada uno de los matraces anteriores.
- L. Agregar una alícuota de 0.15mL de la dilución 10^{-3} A con una micropipeta de 200 μ L, a dos de las placas con los medios Agar Cuenta en Placa y a dos con el medio Agar Papa Dextrosa, rotuladas como dilución 10^{-3} A y 10^{-3} B. Hacer lo mismo con el matraz de la serie B.
- M. Añadir al tubo de ensayo correspondiente a la dilución 10^{-4} A, una alícuota de 1mL de la dilución 10^{-3} A con una micropipeta. Repetir el procedimiento con serie B.
- N. Agitar cada uno de los tubos. Tomar una alícuota de 0.15mL y agregarla a dos placas de Agar Cuenta en Placa y a dos con el medio Agar Papa Dextrosa, rotuladas como dilución 10^{-4} A y 10^{-4} B. Conservar las diluciones 10^{-3} en el refrigerador para utilizarse inmediatamente después en la determinación de coliformes.
- O. Incubar las placas con las condiciones que se indican en la siguiente Tabla:

Microorganismos	T (°C)	Tiempo
Mesófilos aerobios	37°C	24h
Hongos	25°C	3-6 días
Levaduras	25°C	3-6 días

- P. Interpretar los resultados como indican las normas: NOM-092-SSA1-1994 y NOM-111-SSA1-1994 para la cuantificación de microorganismos mesófilos aerobios, hongos y levaduras, respectivamente.

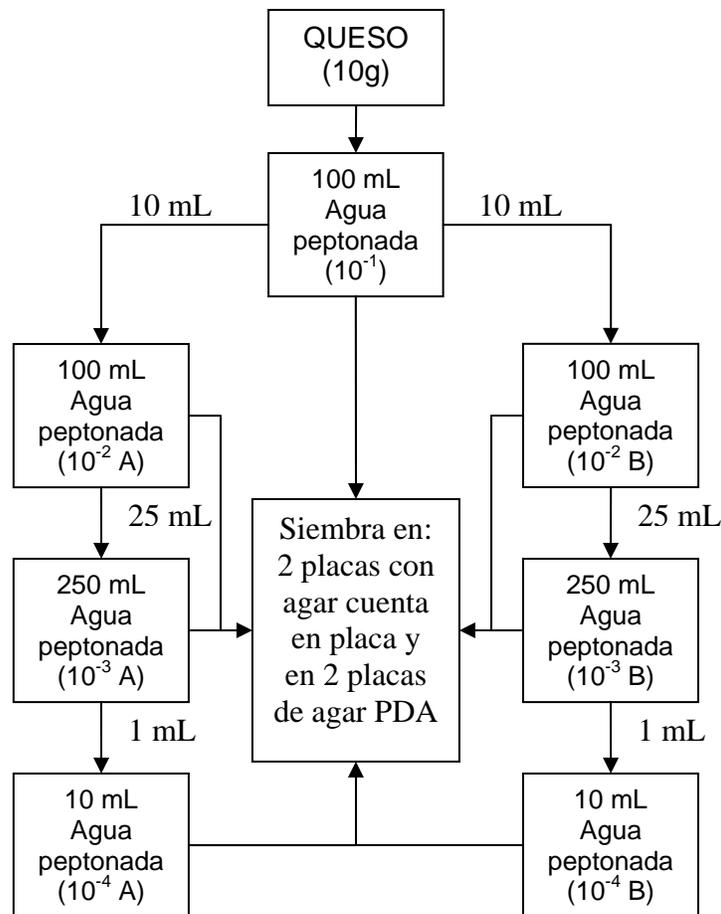


Figura 26. Diagrama de la metodología del análisis microbiológico

1.3.1 Determinación de coliformes y *E. coli* ^(18, 35)

A. Montar el equipo como indica el fabricante Millipore® (Figura 27)

Sistema de filtración

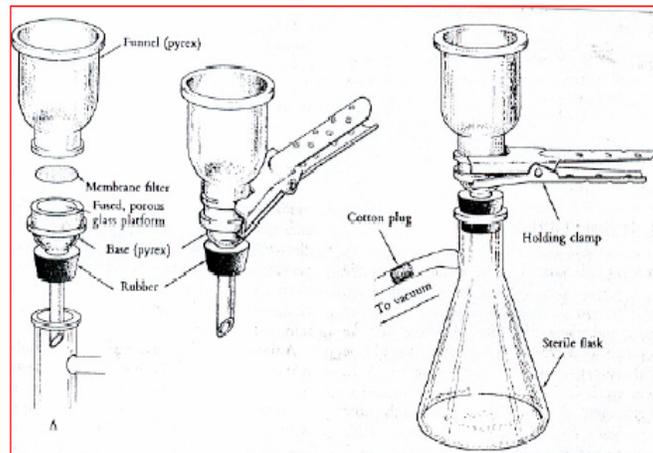


Figura 27. Montaje del equipo de microfiltración Millipore®

- B. Homogenizar la dilución 10^{-2} A en una parrilla de agitación con ayuda de un agitador magnético.
- C. Filtrar un volumen de entre 5-10 mL de la dilución 10^{-2}
- D. Agregar el medio coliBlue 24® directamente en la almohadilla que trae la caja petri, y dejar reposar unos segundos hasta que ésta absorba totalmente el medio (*Figura 28*).

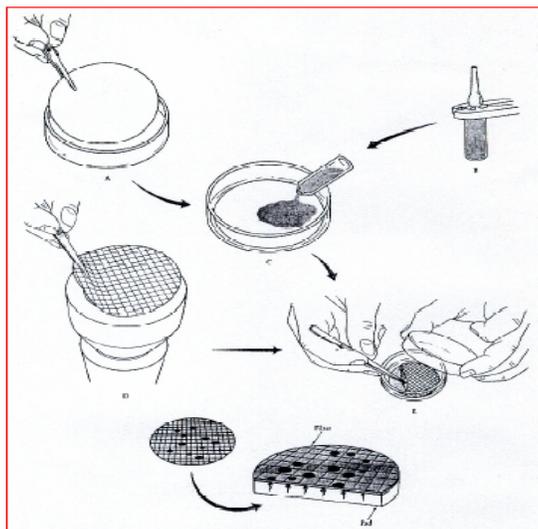


Figura 28. Pasos para la colocación de la membrana en el medio coliBlue 24®

- E. Retirar la membrana con unas pinzas estériles y colocarla sobre la almohadilla de la caja petri con el medio *Figura 28*. Repetir el procedimiento con la serie B.
- F. Filtrar un volumen de entre 50 y 100 mL de la dilución 10^{-3} A, previamente homogenizada. Repetir los pasos D y E.
- G. Incubar a 37 °C durante 24h.
- H. Interpretación de resultados: Con base en lo establecido por el fabricante, las colonias de *E. coli* presentan una coloración azul y las colonias de los otros coliformes presentan una coloración roja, si las colonias no presentan coloración entonces las colonias se consideran negativas para este grupo. El número de colonias por filtro para obtener valores estadísticamente confiables con base a la investigación realizada por Estrada (2006) es de 8 a 80. Si las cuentas se salen de ese rango, no representan el valor real. Por lo que en los casos en que las cuentas fueron < 8 colonias, se consideró que el valor real sería < 10 UFC/g.

2. EXTRACCIÓN DE ADN (Correspondiente a la Sección 5.4.2.1 y 5.4.3)

Como se mencionó en la sección 5.4.3, se siguieron dos metodologías; una consistió en la extracción de ADN directamente de la muestra de queso Cotija las cuales llamaremos “sin enriquecimiento” (SE) y la otra metodología consistió en la extracción de ADN de la muestra de queso Cotija con un previo enriquecimiento (CE).

2.1 Extracción de ADN directamente de la muestra de queso Cotija (SE) y/o cepas

El material que se muestra a continuación, es el requerido para analizar una muestra por duplicado.

2.1.1 Materiales y equipo

- Autoclave (Marca: Yamato, Mod. SM300)
- Campana de flujo laminar (Marca: Industrias Alder, S.A. de C.V.)
- Balanza digital (Marca: Ohaus 600g, Mod. Scout™ Pro)
- Incubadora estática a 37°C (Marca: Gravity Convection, Mod. E-71)
- Incubadora con agitación (Marca: New Brunswick Scientific, Mod. INNOVA 4000)
- Thermomixer (Marca Eppendorf)
- Centrífuga (Marca Termo IEC; modelo Centra CL2)
- Centrífuga (Marca Beckman; Mod. J2-MC)
- Microcentrífuga (Marca Eppendorf)
- Agitador Vortex
- Cuchillo estéril
- Espátula estéril
- 2 Tubos Falcon de 50 mL estériles, para centrífuga Centra CL2
- 2 tubos de 50mL estériles, para centrífuga Beckman J2-MC
- Tubos Eppendorf de 2.0 mL
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Columnas (Kit FAST ID®)
- Micropipeta de 1 mL con sus respectivas puntas estériles
- Micropipeta de 10 µL con sus respectivas puntas estériles
- Micropipeta de 5 mL con sus respectivas puntas estériles

Nota: El material indicado como estéril, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

2.1.2 Reactivos

- Caldo MRS (para la incubación de la cepa de *S. thermophilus*) (Sección 2.1.2.1)
- Aceite mineral (para la incubación de la cepa de *S. thermophilus*)
- Caldo APT (para la incubación del resto de las cepas de BAL) (Sección 2.1.2.2)
- Citrato de sodio 2%, pH 7.8
- Solución de neutrasas
- Solución salina al 0.85%
- Lisozima
- Proteínasa K (10 mg/mL)
- Buffer de Lisis (Kit FAST ID[®])
- Buffer de Unión (Kit FAST ID[®])
- Buffer de Lavado (Kit FAST ID[®])
- Buffer de Elusión (1X TE) (Kit FAST ID[®])
- Etanol grado analítico al 75%
- Etanol al 70% para limpieza de superficies

2.1.2.1 Caldo MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) (OXOID™)

COMPOSICIÓN

Ingredientes	Cantidades (g/L)
Peptona	10.0
Polvo 'Lab-Lemco'	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Mono-oleato de sorbitán	1mL
Fosfato de hidrógeno dipotasio	2.0
Acetato de sodio 3H ₂ O	5.0
Citrato de triamonio	2.0
Sulfato de magnesio 7 H ₂ O	0.2
Sulfato de manganeso 4 H ₂ O	0.05

pH 6.2 ± 0.2

PREPARACIÓN: Disolver 52 g en 1L de agua destilada a 60 °C. Mezclar hasta que este completamente disuelto. Esterilizar en autoclave 15 min. a 121°C.

2.1.2.2 Caldo APT (Difco™)

COMPOSICIÓN

Ingredientes	Cantidades (g/L)
Extracto de levadura	7.5
Digerido pancreático de caseína	12.5
Dextrosa	10.0
Citrato de sodio	5.0
Clorhidrato de tiamina	0.001
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	5.0
Cloruro de manganeso	0.14
Sulfato de magnesio	0.8
Sulfato ferroso	0.04
Polisorbato 80	0.2

pH 6.7 ± 0.2

PREPARACIÓN

Disolver 46.2 g en 1L de agua destilada. Mezclar bien. Caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 min para disolver completamente el polvo. Esterilizar en autoclave 15 min. a 121°C.

2.1.3 Metodología2.1.3.1 Cultivo de las cepas de BAL control

Como se mencionó, se utilizaron diferentes cepas de BAL de identidad conocida como control. Todas las BAL, a excepción de *S. thermophilus*, se inocularon en 5 mL de caldo APT. La cepa de *S. thermophilus* se inoculó en 5 mL de caldo MRS, posteriormente a esta cepa se le añadieron de 1-2 mL de aceite mineral, para así obtener un medio anaerobio. Todas las cepas mencionadas, se incubaron como se indica en la *Tabla 3* (Sección 5.4.2 del Diseño experimental).

2.1.3.2 Extracción de ADN directamente de cepas de BAL

Si la cepa se encuentra en medio líquido:

- A. Centrifugar la muestra a 3 600 rpm (Centrífuga Marca Termo IEC; modelo Centra CL2), durante 15 min para obtener el pellet celular.
- B. Lavar el pellet celular con 500 μ L de solución salina. Trasvasar a un tubo eppendorf de 2.0 mL y centrifugar con las condiciones anteriores. Eliminar el sobrenadante. Realizar el procedimiento dos veces.
- C. Agregar 1 mL de la solución de lisis y la punta de una espátula de lizosima. Agitar vigorosamente en un vortex.
- D. Incubar 30 min a 37 °C a 600 rpm en el Termomixer
- E. Agregar 10 μ L de proteinasa K (10mg/mL)
- F. Incubar de 30 min a 65 °C a 600 rpm en el Termomixer
- G. Dejar un par de minutos a temperatura ambiente. Añadir 250 μ L de cloroformo y agitar vigorosamente.
- H. Centrifugar a 10 000 rpm en la Microcentrífuga (Marca Eppendorf) por 5 min
- I. Con ayuda de una micropipeta, separar la fase acuosa en un tubo eppendorf limpio de 2.0 mL
- J. Añadir el Buffer de unión en relación 1:1 con la fase acuosa
- K. La mezcla debe observarse traslúcida. Si presenta turbidez, centrifugar a 14 000 rpm en la Microcentrífuga durante 5 min, y eliminar el precipitado.
- L. Trasvasar el sobrenadante a una columna. Centrifugar a 1 000 rpm en la Microcentrífuga por 1 min.
- M. Lavar la columna con 700 μ L del Buffer de Lavado. Centrifugar a 14 000 rpm durante 1 min.
- N. Lavar la columna 3 veces con 850 μ L de etanol al 75%. Centrifugar cada vez a 14 000 rpm en la Microcentrífuga durante 1 min.
- O. Centrifugar la columna a 14 000 rpm durante 1 min, para secarla. Desechar el contenedor de la columna. Colocar la columna en un tubo limpio Eppendorf de 1.5 mL.
- P. Eluir y colectar el ADN de la columna con 100-200 μ L de Buffer de Elusión (1X TE). Calentar a 65 °C durante 10 min.
- Q. Centrifugar a 14 000 rpm durante 1 min. Desechar la columna.
- R. Leer absorbancia a 260 y 280 nm. Determinar la pureza del ADN obtenido, así como su concentración con base en las fórmulas descritas en la Sección 5.4.2.1.

Nota: Si la cepa se encuentra en placa con agar, se parte directamente de una o varias colonias y se sigue el protocolo a partir del inciso C.

2.1.3.3 Extracción de ADN directamente del queso Cotija (SE)

- A. En la campana de flujo laminar, cortar un trozo de la muestra de queso Cotija a analizar con ayuda de un cuchillo estéril y pesar 14g en la balanza analítica, directamente en la bolsa para Stomacher.
- B. Añadir 50 mL de citrato de sodio al 2%.
- C. Homogenizar en el Stomacher con agitación fuerte durante 2 min.
- D. Agregar 500 μ L de la solución de neutrasas. Homogenizar e incubar 30 min a 45 °C.
- E. Dividir la mezcla en dos tubos Falcon de 50 mL (25 mL de la mezcla en cada uno de los tubos). Centrifugar a 3 600 rpm (Centrífuga Marca Termo IEC; modelo Centra CL2) durante 5 min.
- F. Con ayuda de la micropipeta de 5 mL, retirar con cuidado la fase intermedia de cada uno de los tubos (*Figura 29*) y trasvasar dicha fase a dos tubos para centrífuga Beckman de 50 mL.

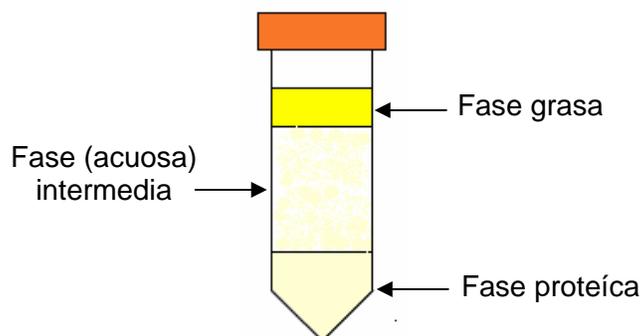


Figura 29. Fases obtenidas después del tratamiento con neutrasas y centrifugación

- G. Centrifugar a 14 000 rpm en Centrífuga (Marca Beckman; Mod. J2-MC) durante 10 min.
- H. Desechar el sobrenadante.
- I. Resuspender el pellet obtenido en 500 μ L de solución salina al 0.85% y trasvasar a un tubo Eppendorf de 2.0 mL.
- J. Centrifugar a 14 000 rpm durante 10 min. Eliminar el sobrenadante.
- K. Seguir el protocolo de la Sección 2.1.3.2, a partir del inciso C.

2.2 Extracción de ADN de la muestra de queso Cotija con enriquecimiento (CE)

El material que se muestra a continuación, es el requerido para analizar una muestra por duplicado.

2.2.1 Materiales y equipo

- Autoclave (Marca: Yamato, Mod. SM300)
- Campana de flujo laminar (Marca: Industrias Alder, S.A. de C.V.)
- Balanza digital (Marca: Ohaus 600g, Mod. Scout™ Pro)
- Incubadora estática a 37°C (Marca: Gravity Convection, Mod. E-71)
- Incubadora con agitación (Marca: New Brunswick Scientific, Mod. INNOVA 4000)
- Thermomixer (Marca Eppendorf)
- Centrífuga (Marca Termo IEC; modelo Centra CL2)
- Centrífuga (Marca Beckman; Mod. J2-MC)
- Microcentrífuga (Marca Eppendorf)
- Agitador Vortex
- Cuchillo estéril
- Espátula estéril
- 2 Tubos Falcon de 50 mL estériles, para centrífuga Centra CL2
- 2 tubos de 50mL estériles, para centrífuga Beckman J2-MC
- Tubos Eppendorf de 2.0 mL
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Micropipeta de 1 mL con sus puntas respectivas estériles
- Micropipeta de 10 µL con sus puntas respectivas estériles
- Micropipeta de 5 mL con sus respectivas puntas estériles

Nota: El material indicado como estéril, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

2.2.2 Reactivos

- 50 mL de caldo APT (Sección 2.1.2.2)
- Solución de neutrasas
- Solución salina al 0.85%
- Lisozima
- Proteinasa K (10 mg/mL)
- Solución de Lisis (Kit FAST ID[®])
- Solución de Unión (Kit FAST ID[®])
- Solución de Lavado (Kit FAST ID[®])
- Solución de Elusión (Kit FAST ID[®])
- Etanol al 75%

2.2.3 Metodología

Para determinar a los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*

- A. En la campana de flujo laminar, cortar un trozo de la muestra de queso Cotija a analizar con ayuda de un cuchillo estéril (Sección 5.2.1) y pesar 7g en la balanza analítica, directamente en la bolsa para Stomacher.
- B. Añadir 50 mL de caldo APT.
- C. Homogenizar en el Stomacher con agitación fuerte durante 2 min.
- D. Dividir la mezcla en dos tubos Falcon de 50 mL (25 mL de la mezcla en cada uno de los tubos)
- E. Incubar a 37 °C durante 24 h.
- F. Agregar 250 µL de la solución de neutrasas a cada uno de los tubos. Homogenizar e incubar 30 min a 45 °C.
- G. Centrifugar a 3 600 rpm durante 5 min
- H. Con ayuda de la micropipeta de 5000 µL, retirar con cuidado la fase intermedia de cada uno de los tubos (*Figura 26*) y trasvasar dicha fase a dos tubos para centrifuga Beckman de 50 mL.
- I. Centrifugar a 14 000 rpm durante 10 min.
- J. Desechar el sobrenadante.
- K. Resuspender el pellet obtenido en 500 µL de solución salina al 0.85% y trasvasar a un tubo Eppendorf de 2.0 mL.
- L. Centrifugar a 14 000 rpm durante 10 min. Eliminar el sobrenadante.

M. Seguir el protocolo de la Sección 2.1.3.2, a partir del inciso C.

Para determinar a los géneros *Streptococcus thermophilus*

- A. En la campana de flujo laminar, cortar un trozo de la muestra de queso Cotija a analizar con ayuda de un cuchillo estéril (Sección 5.2.1) y pesar 7g en la balanza analítica, directamente en la bolsa para Stomacher.
- B. Añadir 50 mL de caldo MRS.
- C. Homogenizar en el Stomacher con agitación fuerte durante 2 min.
- D. Dividir la mezcla en dos tubos Falcon de 50 mL (25 mL de la mezcla en cada uno de los tubos).
- E. Añadir de 3-5 mL de aceite mineral.
- F. Incubar a 42 °C durante 48 h.
- G. Retirar el aceite mineral con ayuda de una micropipeta.
- N. Agregar 250 µL de la solución de neutrasas a cada uno de los tubos. Homogenizar e incubar 30 min a 45 °C.
- O. Centrifugar a 3 600 rpm durante 5 min
- P. Con ayuda de la micropipeta de 5 mL, retirar con cuidado la fase intermedia de cada uno de los tubos (*Figura 26*) y trasvasar dicha fase a dos tubos para centrifuga Beckman de 50 mL.
- Q. Centrifugar a 14 000 rpm durante 10 min.
- R. Desechar el sobrenadante.
- S. Resuspender el pellet obtenido en 500 µL de solución salina al 0.85% y trasvasar a un tubo Eppendorf de 2.0 mL.
- T. Centrifugar a 14 000 rpm durante 10 min. Eliminar el sobrenadante.
- H. Seguir el protocolo de la Sección 2.1.3.2, a partir del inciso C.

3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Correspondiente a la Sección 5.4.2.2)

3.1 Materiales y equipo

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara para electroforesis horizontal
- Fuente de poder
- Campana con aislamiento y sistema purificador para PCR (Marca LAB CONCO)
- Termociclador (Marca Techne, Mod. TC-312)
- Agitador Vortex
- Micropipeta de 200 μ L con sus puntas respectivas estériles
- Micropipeta de 10 μ L con sus puntas respectivas estériles
- Micropipeta de 20 μ L con sus respectivas puntas estériles
- Micropipeta de 2 μ L con sus puntas respectivas estériles
- Tubos para PCR estériles
- Tubos Eppendorf de 0.6 mL

3.2 Reactivos

- Agua grado molecular
- Taq polimerasa marca Fermentas o Invitrogen con sus respectivos buffers y co-factor de Mg^{2+}
- dNTPs
- Cebadores determinados (Tabla 9, Sección 6.2.1)
- Buffer TAE 1X
- Bromuro de etidio ($1\mu g/mL$)
- Agarosa al 1% y al 1.5%
- ADN molde a analizar
- Hielo

3.3 Metodología

- A. Calcular el volumen requerido para una reacción de 25 μL con base a las concentraciones de la siguiente Tabla:

Concentraciones de reactivos para realizar una PCR de 25 μL

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Agua		
Buffer	10X	1X
MgSO ₄	25mM	1.5mM
dNTPs	10mM	0.2mM
Oligo 1	10 μM	0.5 μM
Oligo 2	10 μM	0.5 μM
Taq polimerasa	2.5 U/ μL (<i>Pfu</i> ®, Marca Fermentas) 5.0 U/ μL (<i>Platinum</i> ®, Marca Invitrogen)	1U/reacción
ADN molde	10ng/ μL	100ng/reacción

- B. Programar el Termociclador con las condiciones a utilizar (Tabla 5, 6 ó 7, Sección 5.4.2.2).
- C. Limpiar la campana con etanol al 70% y encender la lámpara UV durante 15 min.
- D. Rotular los tubos para PCR para si identificación con tinta indeleble.
- E. Agregar a cada uno de los tubos el ADN molde respectivo. Reservar.
- F. Por otro lado, agregar a un tubo Eppendorf de 0.6 mL los reactivos restantes en el orden mencionado en la Tabla anterior, a esta mezcla se le denomina Master mix. Es muy importante que la mezcla se encuentre en hielo.
- G. Homogenizar la mezcla.
- H. Trasvasar el volumen requerido de la mezcla Master mix a cada uno de los tubos para PCR que contienen el ADN molde.
- I. Homogenizar la mezcla.
- J. Colocar en el Termociclador e iniciar la corrida
- K. Preparar los geles de agarosa con el porcentaje requerido (Sección 5.4.2.2). Al preparar el gel, se le adiciona con precaución 1 μL de bromuro de etidio a la agarosa fundida. Colocar en cada uno de los pozos del gel la muestra amplificada.
- L. Correr la electroforésis horizontal a 85 V.
- M. Observar el patrón de bandas bajo la luz UV.

10. ANEXO II

Resultados

(Correspondiente a la sección 6)

TABLAS DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO GENERAL (Correspondiente a la Sección 6.1) MUESTRA 1

a) Mesófilos aerobios (24h, 35 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-092- SSA1-1994

Dilución	Serie	# Colonias	UFC/g
10 ⁻¹	A	> 250	---
	B	> 250	---
10 ⁻²	A ₁	> 250	---
	A ₂	> 250	---
	B ₁	> 250	---
	B ₂	> 250	---
10 ⁻³	A ₁	230*	1.5*10 ⁶
	A ₂	237*	1.6*10 ⁶
	B ₁	209*	1.4 *10 ⁶
	B ₂	236*	1.6*10 ⁶
10 ⁻⁴	A ₁	41*	2.7*10 ⁶
	A ₂	39*	2.6 *10 ⁶
	B ₁	109*	7.3*10 ⁶ *
	B ₂	104*	6.9*10 ⁶ *
\bar{X}	3.2 *10 ⁶ UFC/g		

* Colonias consideradas para el conteo

Se reportan: 3 200 000 unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g), de bacterias aerobias en placa con agar para cuenta estándar, incubadas 24 horas a 35°C.

b) Hongos y levaduras (6 días, 24 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-111-SSA1-1994

Dilución	Serie	# colonias		UFC/g	
		Hongos	Levaduras	Hongos	Levaduras
10 ⁻¹	A	0	141*	< 67	9,400
	B	0	124*	< 67	8,300
10 ⁻²	A ₁	0	15*	< 67	10,000
	A ₂	0	12*	< 67	8,000
	B ₁	0	8	< 67	5 000 v.e
	B ₂	0	13*	< 67	8,700
10 ⁻³	A ₁	0	0	< 67	< 67
	A ₂	0	5	< 67	30 000 v.e
	B ₁	0	0	< 67	< 67
	B ₂	0	0	< 67	< 67
10 ⁻⁴	A ₁	0	14**	< 67	900 000**
	A ₂	0	0	< 67	< 67
	B ₁	0	2	< 67	100 000 v.e
	B ₂	0	0	< 67	< 67
\bar{X}				< 67	8 900

* Colonias consideradas para el conteo

** No se consideró en la cuenta debido a que el resto de las réplicas es diferente

Se reportan: 8 900 UFC de levaduras /g_{queso} en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C. < 67 UFC/g de hongos en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C.

c) Coliformes totales y fecales (24h y 48h a 35 °C)

Dilución	Serie	# colonias (azules/ rojas)	Vol. filtrado (mL)	(g) queso	Coliformes totales (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/ g)
		24h			24h	
10 ⁻²	A ₁	0/0	5	0.05	< 10	< 10
	A ₂	0/1*	5	0.05	20 v.e*	< 10
	B ₁	1/6*	10	0.1	70 v.e.*	10 v.e
	B ₂	0/0	5	0.05	< 10	< 10
10 ⁻³	A ₁	0/0	80	0.08	< 10	< 10
	A ₂	0/0	80	0.08	< 10	< 10
	B ₁	0/2*	80	0.08	38 v.e*	< 10
	B ₂	0/0	80	0.08	< 10	< 10
\bar{X}					<10	<10

v.e.; valor estimado

* No se consideran porque no entran dentro del rango establecido para el método (de 8 a 80 colonias)

Se reportan: < 10 UFC/g, de bacterias coliformes totales en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C; y la presencia de < 10 UFC/g de *Escherichia coli* en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

Observaciones: La serie B₁ de la dilución 10⁻² tardó más de 30 min en filtrar, las series restantes de la misma dilución tardaron menos de 1 min, las partículas de queso se distribuyeron homogéneamente en la superficie de la membrana. Las series correspondientes a la dilución 10⁻³ tardaron < 10 min en filtrar, observándose también una distribución homogénea de la muestra en la superficie de la membrana.

MUESTRA 2

a) Mesófilos aerobios (24h, 35 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-092- SSA1-1994

Dilución	Serie	# Colonias	UFC/g
10 ⁻¹	A	> 250	---
	B	> 250	---
10 ⁻²	A ₁	> 250	---
	A ₂	> 250	---
	B ₁	> 250	---
	B ₂	> 250	---
10 ⁻³	A ₁	> 250	---
	A ₂	> 250	---
	B ₁	> 250	---
	B ₂	> 250	---
10 ⁻⁴	A ₁	73*	4.9*10 ⁶
	A ₂	79*	5.3*10 ⁶
	B ₁	58*	3.9*10 ⁶
	B ₂	69*	4.6*10 ⁶
\bar{X}	4.7*10 ⁶ UFC/g		

* Colonias consideradas para el conteo

Se reportan:

4 700 000 UFC/g de bacterias aerobias en placa con agar para cuenta estándar, incubadas 24 horas a 35 °C.

b) Hongos y levaduras (6 días, 24 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-111-SSA1-1994

Dilución	Serie	# colonias		UFC/g	
		Hongos	Levaduras	Hongos	Levaduras
10 ⁻¹	A	1	1	< 67	<67
	B	0	0	< 67	< 67
10 ⁻²	A ₁	0	0	< 67	< 67
	A ₂	0	0	< 67	< 67
	B ₁	0	0	< 67	< 67
	B ₂	0	0	< 67	< 67
10 ⁻³	A ₁	0	0	< 67	< 67
	A ₂	0	0	< 67	< 67
	B ₁	0	0	< 67	< 67
	B ₂	0	0	< 67	< 67
10 ⁻⁴	A ₁	0	0	< 67	< 67
	A ₂	0	0	< 67	< 67
	B ₁	0	0	< 67	< 67
	B ₂	0	0	< 67	< 67
\bar{X}				< 67	<67

Se reporta: Menos de 67 UFC/g de hongos y levaduras en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C.

c) Coliformes totales y fecales (24h, 35 °C)

Dilución	Serie	# colonias (azules/rojas)	Vol. filtrado (mL)	(g) queso	Coliformes totales (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)
		24h			24h	
10 ⁻²	A ₁	0/42	10	0.1	420	< 10
	A ₂	0/32	10	0.1	320	< 10
	B ₁	0/36	10	0.1	360	< 10
	B ₂	0/33	10	0.1	330	< 10
10 ⁻³	A ₁	0/19	50	0.05	380	< 10
	A ₂	0/22	50	0.05	440	< 10
	B ₁	0/39	95	0.095	410	< 10
	B ₂	0/28	55	0.055	510	< 10
\bar{X}					400	< 10

Se reportan:

400 UFC/g, de bacterias coliformes totales en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

No se detectó a *E. coli* en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

Observaciones: Las series de la dilución 10⁻² tardaron < de 15 min en filtrar, mientras que las series de la dilución 10⁻³ tardaron < de 30 min en filtrar. Por otro lado la muestra se distribuyó uniformemente en la superficie de la membrana.

MUESTRA 3

a) Mesófilos aerobios (24h, 35 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-092- SSA1-1994

Dilución	Serie	# Colonias	UFC/g
10 ⁻¹	A	> 250	---
	B	> 250	---
10 ⁻²	A ₁	> 250	---
	A ₂	> 250	---
	B ₁	> 250	---
	B ₂	> 250	---
10 ⁻³	A ₁	49*	3.3*10 ⁵
	A ₂	51*	3.4*10 ⁵
	B ₁	109*	7.3*10 ⁵
	B ₂	97*	6.5*10 ⁵
10 ⁻⁴	A ₁	6	---
	A ₂	7	---
	B ₁	5	---
	B ₂	9	---
\bar{X}	5.10 *10 ⁵ UFC/g		

* Colonias consideradas para el conteo

Se reportan: 510 000 UFC/g, de bacterias aerobias en placa con agar para cuenta estándar, incubadas 24 horas a 35 °C.

b) Hongos y levaduras (6 días, 24 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-111-SSA1-1994

Dilución	Serie	# colonias		UFC/g	
		Hongos	Levaduras	Hongos	Levaduras
10 ⁻¹	A	0	1*	<67	67 v.e
	B	0	0	<67	<67
10 ⁻²	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
10 ⁻³	A ₁	0	1*	<67	67*10 ² v.e
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	1*	<67	67*10 ² v.e
	B ₂	0	0	<67	<67
10 ⁻⁴	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
\bar{X}			< 67	<67	

* No entran dentro del rango estipulado en la NOM-111-SSA1-1994

Se reporta: Menos de 67 UFC/g de hongos y levaduras en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C.

c) Coliformes totales y fecales (24h, 35 °C)

Dilución	Serie	# colonias (azules/rojas)	Vol. filtrado (mL)	(g) queso	Coliformes totales (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)
		24h			24h	
10 ⁻²	A ₁	0/1*	10	0.1	10 v.e*	< 10
	A ₂	0/0	10	0.1	< 10	< 10
	B ₁	0/1*	10	0.1	10 v.e*	< 10
	B ₂	0/0	10	0.1	< 10	< 10
10 ⁻³	A ₁	0/0	50	0.05	< 10	< 10
	A ₂	0/3*	50	0.05	60 v.e*	< 10
	B ₁	0/0	70	0.07	< 10	< 10
	B ₂	0/0	70	0.07	< 10	< 10
\bar{X}					< 10	< 10

* No se considera para el conteo puesto que no entran dentro del rango establecido para el método

Se reporta:

< 10 UFC/g de bacterias coliformes totales en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

< 10 UFC/g de *Escherichia coli* en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

Observaciones: Las series de la primera dilución tardaron < de 1 min en filtrar, mientras que las series A₁ y A₂ de la dilución 10⁻³, tardaron < de 5 min y las dos series restantes 30 min. Cabe mencionar que en las series correspondientes a la dilución 10⁻³ se observó una ligera aglomeración de la muestra en algunas zonas de la membrana.

MUESTRA 4

a) Mesófilos aerobios (24h, 35 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-092-SSA1-1994

Dilución	Serie	# Colonias	UFC/g
10 ⁻¹	A	> 250	---
	B	> 250	---
10 ⁻²	A ₁	100*	6.7*10 ⁴
	A ₂	102*	6.8*10 ⁴
	B ₁	99*	6.6*10 ⁴
	B ₂	83*	5.5*10 ⁴
10 ⁻³	A ₁	10	---
	A ₂	7	---
	B ₁	6	---
	B ₂	6	---
10 ⁻⁴	A ₁	0	---
	A ₂	0	---
	B ₁	2	---
	B ₂	3	---
\bar{X}	6.4 *10 ⁴ UFC/g		

* Colonias consideradas para el conteo
Se reportan: 64 000 UFC/g de bacterias aerobias en placa con agar para cuenta estándar, incubadas 24 horas a 35 °C.

b) Hongos y levaduras (6 días, 24 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-111-SSA1-1994

Dilución	Serie	# colonias		UFC/g	
		Hongos	Levaduras	Hongos	Levaduras
10 ⁻¹	A	0	0	<67	<67
	B	0	0	<67	<67
10 ⁻²	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
10 ⁻³	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
10 ⁻⁴	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
\bar{X}			< 67	<67	

Se reporta: Menos de 67 UFC/g de hongos y levaduras en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C.

c) Coliformes totales y fecales (24h, 35 °C)

Dilución	Serie	# colonias (azules/rojas)	Vol. filtrado (mL)	(g) queso	Coliformes totales (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)
		24h			24h	
10 ⁻²	A ₁	1/4*	10	0.1	50 v.e.*	10 v.e.
	A ₂	0/3*	5	0.05	60 v.e.*	< 10
	B ₁	0/1*	5	0.05	20 v.e.*	< 10
	B ₂	0/3*	5	0.05	60 v.e.*	< 10
10 ⁻³	A ₁	0/3*	60	0.06	50 v.e.*	< 10
	A ₂	0/3*	60	0.06	50 v.e.*	< 10
	B ₁	0/1*	55	0.055	18 v.e.*	< 10
	B ₂	0/1*	55	0.055	18 v.e.*	< 10
\bar{X}					<10	<10

v.e.; valor estimado

* No se considera para el conteo puesto que no entran dentro del rango establecido para el método

Se reporta:

< 10 UFC/g de bacterias coliformes totales en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

Presencia de < 10 UFC/g de *Escherichia coli* en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

MUESTRA 5

a) Mesófilos aerobios (24h, 35 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-092- SSA1-1994

Dilución	Serie	# Colonias	UFC/g
10 ⁻¹	A	> 250	---
	B	> 250	---
10 ⁻²	A ₁	> 250	---
	A ₂	> 250	---
	B ₁	> 250	---
	B ₂	> 250	---
10 ⁻³	A ₁	29*	1.9*10 ⁵
	A ₂	47*	3.1*10 ⁵
	B ₁	32*	2.1*10 ⁵
	B ₂	40*	2.7*10 ⁵
10 ⁻⁴	A ₁	3	2.0*10 ⁵ v.e
	A ₂	1	6.7*10 ⁴ v.e
	B ₁	1	6.7*10 ⁴ v.e
	B ₂	0	---
\bar{X}	2.5 *10 ⁵ UFC/g		

* Colonias consideradas para el conteo

Se reportan:

250 000 UFC/g de bacterias aerobias en placa con agar para cuenta estándar, incubadas 24 horas a 35 °C.

b) Hongos y levaduras (6 días, 24 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-111-SSA1-1994

Dilución	Serie	# colonias		UFC/g	
		Hongos	Levaduras	Hongos	Levaduras
10 ⁻¹	A	0	1	<67	<67
	B	0	1	<67	<67
10 ⁻²	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	1	<67	<67
10 ⁻³	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
10 ⁻⁴	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
\bar{X}			< 67	<67	

Se reporta: Menos de 67 UFC/g de hongos y levaduras en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C.

c) Coliformes totales y fecales (24h, 35 °C)

Dilución	Serie	# colonias (azules/rojas)	Vol. filtrado (mL)	(g) queso	Coliformes totales (UFC/g)	E. coli (UFC/g)
		24h			24h	
10 ⁻²	A ₁	0/33	10	0.1	330	< 10
	A ₂	0/46	10	0.1	460	< 10
	B ₁	0/35	10	0.1	350	< 10
	B ₂	0/33	10	0.1	330	< 10
10 ⁻³	A ₁	0/23	70	0.07	330	< 10
	A ₂	0/7	60	0.06	117 v.e.*	< 10
	B ₁	1/7	55	0.055	145 v.e.*	18 v.e.
	B ₂	0/16	55	0.055	290	< 10
\bar{X}					340	<10

** No se considera para el conteo puesto que no entran dentro del rango de confiabilidad

Se reporta:

340 UFC/g de bacterias coliformes totales en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

Presencia de < 10 UFC/g de *Escherichia coli* en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

Observaciones: Todas las series de la dilución 10⁻² se tardaron menos de 1 min en filtrar. La serie A₁ de la dilución 10⁻³ se tardó 1h 20min, la serie A₂ 50min, y las dos últimas series tardaron 40min cada una en filtrar, también se observó la aglomeración de la muestra, principalmente en el centro.

MUESTRA 6

a) Mesófilos aerobios (24h, 35 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-092- SSA1-1994

Dilución	Serie	# Colonias	UFC/g
10 ⁻¹	A	32*	2 100*
	B	40*	2 700*
10 ⁻²	A ₁	7	4 700 v.e
	A ₂	4	2 700 v.e
	B ₁	7	4 700 v.e
	B ₂	7	4 700 v.e
10 ⁻³	A ₁	0	---
	A ₂	0	---
	B ₁	0	---
	B ₂	0	---
10 ⁻⁴	A ₁	1	---
	A ₂	0	---
	B ₁	0	---
	B ₂	0	---
\bar{X}	2 400 UFC/g		

* Colonias consideradas para el conteo v.e., valor estimado

Se reportan:

2 400 UFC/g de bacterias aerobias en placa con agar para cuenta estándar, incubadas 24 horas a 35 °C.

b) Hongos y levaduras (6 días, 24 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-111-SSA1-1994

Dilución	Serie	# colonias		UFC/g	
		Hongos	Levaduras	Hongos	Levaduras
10 ⁻¹	A	0	0	<67	<67
	B	0	0	<67	<67
10 ⁻²	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
10 ⁻³	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
10 ⁻⁴	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
\bar{X}			< 67	<67	

Se reporta: Menos de 67 UFC/g de hongos y levaduras en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C.

c) Coliformes totales y fecales (24h, 35 °C)

Dilución	Serie	# colonias (azules/rojas)	Vol. filtrado (mL)	(g) queso	Coliformes totales (UFC/g)	E. coli (UFC/g)
		24h			24h	
10 ⁻²	A ₁	0/0	10	0.1	< 10	< 10
	A ₂	0/0	10	0.1	< 10	< 10
	B ₁	0/0	10	0.1	< 10	< 10
	B ₂	0/0	10	0.1	< 10	< 10
10 ⁻³	A ₁	0/1*	65	0.065	15 v.e.*	< 10
	A ₂	0/1*	70	0.07	14 v.e.*	< 10
	B ₁	0/0	65	0.065	< 10	< 10
	B ₂	0/1*	70	0.07	14 v.e.*	< 10
\bar{X}					<10	< 10

* v.e., valor estimado

Se reporta:

< 10 UFC/g de bacterias coliformes totales en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

< 10 UFC/g de *Escherichia coli* en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

Observaciones: Todas las series de la dilución 10⁻² se tardaron menos de 1min en filtrar. La serie A₁ de la dilución 10⁻³ se tardón menos de 5min en filtrar, la serie A₂ 15min, la B₁ 25 min y la serie B₂ 2h, también se observó aglomeración de la muestra en la superficie de la membrana, principalmente en el centro.

MUESTRA 7

a) Mesófilos aerobios (24h, 35 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-092- SSA1-1994

Dilución	Serie	# Colonias	UFC/g
10 ⁻¹	A	> 250	---
	B	> 250	---
10 ⁻²	A ₁	> 250	---
	A ₂	> 250	---
	B ₁	> 250	---
	B ₂	> 250	---
10 ⁻³	A ₁	68*	4.5*10 ⁵
	A ₂	81*	5.4*10 ⁵
	B ₁	70*	4.7*10 ⁵
	B ₂	76*	5.1*10 ⁵
10 ⁻⁴	A ₁	11	---
	A ₂	5	---
	B ₁	11	---
	B ₂	9	---
\bar{X}		4.9*10 ⁵	

* Colonias consideradas para el conteo

Se reportan:

490 000 UFC/g de bacterias aerobias en placa con agar para cuenta estándar, incubadas 24 horas a 35 °C.

b) Hongos y levaduras (6 días, 24 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-111-SSA1-1994

Dilución	Serie	# colonias		UFC/g	
		Hongos	Levaduras	Hongos	Levaduras
10 ⁻¹	A	0	34*	<67	2 300*
	B	0	36*	<67	2 400*
10 ⁻²	A ₁	0	2	<67	1 333 v.e
	A ₂	0	14**	<67	9 333 v.e
	B ₁	0	6	<67	4 000 v.e
	B ₂	0	7	<67	4 667 v.e
10 ⁻³	A ₁	0	2	<67	13 333 v.e
	A ₂	0	1	<67	6 667 v.e
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
10 ⁻⁴	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
\bar{X}				< 67	2 400

* Colonias consideradas para el conteo

** No se considero en la cuenta, debido a que sus réplicas son menores

Se reporta: 2 400 UFC/g de levaduras en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C.

Menos de 67 UFC/g de hongos en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C.

c) Coliformes totales y fecales (24h, 35 °C)

Dilución	Serie	# colonias (azules/rojas)	Vol. filtrado (mL)	(g) queso	Coliformes totales (UFC/g)	E. coli (UFC/g)
		24h			24h	
10 ⁻²	A ₁	0/1*	10	0.1	10 v.e.*	< 10
	A ₂	0/4*	10	0.1	40 v.e.*	< 10
	B ₁	0/2*	10	0.1	20 v.e.*	< 10
	B ₂	0/4*	10	0.1	40 v.e.*	< 10
10 ⁻³	A ₁	0/0	60	0.06	< 10	< 10
	A ₂	0/0	50	0.05	< 10	< 10
	B ₁	0/0	60	0.06	< 10	< 10
	B ₂	0/0	60	0.06	< 10	< 10
\bar{X}					<10	< 10

v.e., valor estimado

* No se considera para el conteo puesto que no entran dentro del rango establecido para el método

Se reporta:

< 10 UFC/g de bacterias coliformes totales en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

No se detectó *Escherichia coli* en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

MUESTRA 8

a) Mesófilos aerobios (24h, 35 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-092- SSA1-1994

Dilución	Serie	# Colonias	UFC/g
10 ⁻¹	A	> 250	---
	B	> 250	---
10 ⁻²	A ₁	250*	1.7*10 ⁵
	A ₂	> 250	---
	B ₁	> 250	---
	B ₂	> 250	---
10 ⁻³	A ₁	17	113 333 v.e
	A ₂	25*	1.7*10 ⁵
	B ₁	29*	1.9*10 ⁵
	B ₂	156*	1.0*10 ⁶
10 ⁻⁴	A ₁	0	---
	A ₂	1	66 667 v.e
	B ₁	---	---
	B ₂	---	---
\bar{X}		3.1*10 ⁵	

v.e., valor estimado

* Colonias consideradas para el conteo

Se reportan:
310 000 UFC/g de bacterias aerobias en placa con agar para cuenta estándar, incubadas 24 horas a 35 °C.

b) Hongos y levaduras (6 días, 24 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-111-SSA1-1994

Dilución	Serie	# colonias		UFC/g	
		Hongos	Levaduras	Hongos	Levaduras
10 ⁻¹	A	0	0	<67	<67
	B	0	0	<67	<67
10 ⁻²	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
10 ⁻³	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
10 ⁻⁴	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	1	0	67 000 v.e	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
	\bar{X}			< 67	< 67

Se reporta: Menos de 67 UFC/g de levaduras en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C.

Menos de 67 UFC/g de hongos en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C.

c) Coliformes totales y fecales (24h, 35 °C)

Dilución	Serie	# colonias (azules/rojas)	Vol. filtrado (mL)	(g) queso	Coliformes totales (UFC/g)	E. coli (UFC/g)
		24h			24h	
10 ⁻²	A ₁	0/23	10	0.1	230	< 10
	A ₂	0/26	10	0.1	260	< 10
	B ₁	2/13	10	0.1	150	20 v.e.*
	B ₂	1/14	10	0.1	150	10 v.e.*
10 ⁻³	A ₁	0/6**	70	0.07	86 v.e*	< 10
	A ₂	0/4**	70	0.07	57 v.e*	< 10
	B ₁	0/0	60	0.06	< 10	< 10
	B ₂	0/0	65	0.065	< 10	< 10
\bar{X}					200	<10

* No se considera para el conteo puesto que no entran en el rango de confiabilidad del método

Se reporta:

200 UFC/g de bacterias coliformes totales en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

Presencia de < 10 UFC/g de *Escherichia coli* en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

Observaciones: Todas las series de la dilución 10⁻², se filtran en menos de 1min. Y las series de la dilución 10⁻³ se filtraron en menos de 2min. En todos los casos se observo aglomeración de la muestra en el centro de la membrana.

MUESTRA 9

a) Mesófilos aerobios (48h, 35 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-092- SSA1-1994

Dilución	Serie	# Colonias	UFC/g
10 ⁻¹	A	> 250	---
	B	> 250	---
10 ⁻²	A ₁	46*	31 000
	A ₂	149*	99 000
	B ₁	123*	82 000
	B ₂	93*	62 000
10 ⁻³	A ₁	9	60 000 v.e
	A ₂	7	46 667 v.e
	B ₁	6	40 000 v.e
	B ₂	13	86 667 v.e
10 ⁻⁴	A ₁	0	---
	A ₂	0	---
	B ₁	0	---
	B ₂	0	---
\bar{X}	69 000		

* Colonias consideradas para el conteo

Se reportan:
69 000 UFC/g de bacterias aerobias en placa con agar para cuenta estándar, incubadas 48 horas a 35 °C.

b) Hongos y levaduras (3 días, 24 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-111-SSA1-1994

Dilución	Serie	# colonias		UFC/g	
		Hongos	Levaduras	Hongos	Levaduras
10 ⁻¹	A	0	> 150	<67	---
	B	0	> 150	<67	---
10 ⁻²	A ₁	0	> 150	<67	---
	A ₂	0	> 150	<67	---
	B ₁	0	> 150	<67	---
	B ₂	0	> 150	<67	---
10 ⁻³	A ₁	0	32*	<67	2.1*10 ⁵
	A ₂	0	35*	<67	2.3*10 ⁵
	B ₁	0	25*	<67	1.7*10 ⁵
	B ₂	0	33*	<67	2.2*10 ⁵
10 ⁻⁴	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	1	<67	66 667 v.e
	B ₂	0	5	<67	333 333 v.e
\bar{X}				<67	2.1*10 ⁵

* Colonias consideradas para el conteo

Se reporta: 210 000 UFC/g de levaduras en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C.
Menos de 67 UFC/g de hongos en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C.

c) Coliformes totales y fecales (24h, 35 °C)

Dilución	Serie	# colonias (azules/rojas)	Vol. filtrado (ml)	(g) queso	Coliformes totales (UFC/g)	E. coli (UFC/g)
		24h			24h	
10 ⁻²	A ₁	0/0	10	0.1	< 10	< 10
	A ₂	2/0*	10	0.1	< 10	20 v.e. *
	B ₁	0/0	10	0.1	< 10	< 10
	B ₂	0/0	10	0.1	< 10	< 10
10 ⁻³	A ₁	0/0	65	0.065	< 10	< 10
	A ₂	0/0	70	0.07	< 10	< 10
	B ₁	0/1*	65	0.065	15 v.e.*	< 10
	B ₂	0/0	70	0.07	< 10	< 10
\bar{X}					< 10	< 10

* No se considera para el conteo puesto que no entran dentro del rango de confiabilidad establecido para el método

Se reporta:

< 10 UFC/g de bacterias coliformes totales en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

Presencia de < 10 UFC/g de *Escherichia coli* en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

Observaciones: Todas las series de la dilución 10⁻² tardaron en filtrarse menos de 1min. Las series A₁ y A₂ tardaron 45min en filtrar cada una, las series B₁ y B₂ tardaron menos de 15 min. En todos los casos se observó aglomeración de la muestra en la superficie de la membrana.

MUESTRA 10

a) Mesófilos aerobios (48h, 35 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-092- SSA1-1994

Dilución	Serie	# Colonias	UFC/g
10 ⁻¹	A	83*	5 500
	B	86*	5 700
10 ⁻²	A ₁	45*	30 000
	A ₂	31*	21 000
	B ₁	42*	28 000
	B ₂	48*	32 000
10 ⁻³	A ₁	5	33 000v.e
	A ₂	9	60 000 v.e
	B ₁	11	73 000v.e
	B ₂	8	53 000 v.e
10 ⁻⁴	A ₁	1	67 000 v.e
	A ₂	1	67 000 v.e
	B ₁	1	67 000 v.e
	B ₂	0	0
\bar{X}		1.7*10 ⁴	

v.e., valor estimado

* Colonias consideradas para el conteo

Se reportan:

17 000 UFC/g de bacterias aerobias en placa con agar para cuenta estándar, incubadas 48 horas a 35 °C.

b) Hongos y levaduras (3 días, 24 °C). Expresión de resultados con base en la NOM-111-SSA1-1994

Dilución	Serie	# colonias		UFC/g	
		Hongos	Levaduras	Hongos	Levaduras
10 ⁻¹	A	0	> 150	<67	---
	B	0	132*	<67	8 800
10 ⁻²	A ₁	0	9	<67	6 000 v.e.
	A ₂	0	10*	<67	6 700
	B ₁	0	18*	<67	12 000
	B ₂	0	15*	<67	10000
10 ⁻³	A ₁	0	1	<67	6 667 v.e.
	A ₂	0	1	<67	6 667 v.e.
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	3	<67	20 000 v.e.
10 ⁻⁴	A ₁	0	0	<67	<67
	A ₂	0	0	<67	<67
	B ₁	0	0	<67	<67
	B ₂	0	0	<67	<67
\bar{X}				< 67	9 200

* Colonias consideradas para el conteo

Se reporta: 9 200 UFC/g de levaduras en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C. Menos de 67 UFC/g de hongos en placa con medio Agar Papa Dextrosa acidificado, incubadas 6 días a 24 °C.

b) Coliformes totales y fecales (24h, 35 °C)

Dilución	Serie	# colonias (azules/rojas)	Vol. filtrado (mL)	(g) queso	Coliformes totales (UFC/g)	E. coli (UFC/g)
		24h			24h	
10 ⁻²	A ₁	0/0	10	0.1	< 10	< 10
	A ₂	0/0	10	0.1	< 10	< 10
	B ₁	0/0	10	0.1	< 10	< 10
	B ₂	0/1*	10	0.1	10 v.e.*	< 10
10 ⁻³	A ₁	0/2*	65	0.065	31 v.e*	< 10
	A ₂	0/0	50	0.05	< 10	< 10
	B ₁	1/0*	70	0.07	< 10	14 v.e*
	B ₂	0/0	70	0.07	< 10	< 10
\bar{X}					<10	<10
σ						
%CV						

* No se considera para el conteo puesto que no entran dentro del rango de confiabilidad establecido para el método

Se reporta:

< 10 UFC/g de bacterias coliformes totales en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

Presencia de < 10 UFC/g de *Escherichia coli* en placa con medio ColiBlue24, incubadas 24 horas a 35 °C.

Observaciones: La serie A₁ de la dilución 10⁻² tardó 30min en filtrarse, las series restantes, tardaron < 2min en filtrarse cada una. Las series A₁ y A₂ de la dilución 10⁻³ se tardaron 1h 40min en filtrarse cada una, la serie B₁ se tardón menos de 10min en filtrar, y la serie B₂ se tardón 45min. En todos los casos se observó aglomeración de la muestra sobre la superficie de la membrana.

BÚSQUEDA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN EL QUESO COTIJA (Correspondiente a la Sección 6.2)

a) Prueba de especificidad de los cebadores seleccionados.

Tabla 1. Resultados de la medición de absorbancia del ADN de las cepas puras

Microorganismo	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} / A ₂₈₀	Conc. (ng/μL)
<i>Lactobacillus casei</i> PP201*	0.1886	0.1008	1.87	47.15
	0.1257	0.0721	1.74	31.42
<i>Streptococcus thermophilus</i> NCFB 859*	0.0819	0.0634	1.29	20.475
	0.1055	0.0839	1.26	26.375
<i>Lactobacillus paracasei</i> ***	0.2087	0.1713	1.22	52.17
	0.1147	0.0815	1.41	28.67
<i>Enterococcus faecalis</i> ***	0.0846	0.0647	1.31	21.15
	0.0812	0.0607	1.34	20.3
<i>Enterococcus faecium</i> ***	0.0598	0.0441	1.35	14.95
	0.0927	0.077	1.20	13.175
<i>Lactococcus lactis</i> **	0.0566	0.0409	1.38	14.15
	0.2751	0.1282	2.14	68.77
Cápsula ingerible	0.6281	0.3407	1.84	157.025
	0.6418	0.3530	1.82	160.45

* Cepas proporcionadas por la UAM Iztapalapa

** Cepas proporcionadas por la Dra. Carmen Wachter

*** Cepas aisladas del Queso Cotija

b) Búsqueda de las BAL en el queso Cotija

Tabla 2. Resultados de la medición de absorbancia del ADN de las muestras de queso Cotija

MUESTRA	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} / A ₂₈₀	Conc. (ng/μL)
Q1 SE	0.1126	0.0682	1.65	28.15
	0.1088	0.0593	1.83	27.2
Q1 CE	0.0690	0.0489	1.41	17.25
	0.0530	0.0312	1.69	13.25
Q2 SE	0.0894	0.602	1.485	22.35
	0.0806	0.0491	1.64	20.15
Q2 CE	0.0633	0.0435	1.45	15.82
	0.0613	0.0359	1.71	15.32
Q3 SE	0.1277	0.0875	1.459	31.925
	0.1180	0.0801	1.47	29.5
Q3 CE	0.1503	0.1058	1.42	37.575
	0.1310	0.0836	1.57	32.75
Q4 SE	0.3651	0.1844	1.98	91.275
	0.3323	0.1731	1.92	83.075
Q4 CE	0.3975	0.2726	1.46	99.375
	1.4345	1.2123	1.18	358.625
Q5 SE	0.1196	0.0772	1.55	29.9
	0.0806	0.0395	2.04	20.15
Q5 CE	0.1638	0.0948	1.72	40.95
	0.1254	0.0632	1.98	31.35
Q6 SE	0.2979	0.2241	1.33	74.475
	0.1189	0.0777	1.53	29.725
Q6 CE	0.1081	0.602	1.79	27.025
	0.2295	0.1912	1.2	57.375
Q7 SE	2.4280	2.1120	1.15	607
	1.3898	1.1499	1.21	347.45
Q7 CE	0.1424	0.1017	1.4	35.6
	0.1340	0.0960	1.39	33.5
Q8 SE	0.0701	0.0456	1.54	17.52
	0.0302	0.0135	2.23	7.55
Q8 CE	0.1204	0.0683	1.76	30.1
	0.0974	0.0488	1.99	24.35
Q9 SE	0.0464	0.0241	1.92	11.6
	0.0452	0.0244	1.85	11.3
Q9 CE	0.0966	0.0696	1.34	24.15
	0.0533	0.0280	1.9	13.32
Q10 SE	0.1111	0.0731	1.52	27.77
	0.2297	0.1431	1.6	57.42

11. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Altschul S.F., Gish W., Miller E.W., Lipman D.J., NCBI, **BLAST**. [en línea] Actualizado: 16 Febrero 2009, [Consultado Marzo 2009] Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/BLAST#cite_ref-gapped_blast_1-0
- (2) Álvarez Barajas Rubén, Barragán López Esteban, Chombo Morales Patricia, **Reglas de uso. Marca Colectiva Queso Cotija Región de Origen**, México, 2005, 1,10, 12,14,15
- (3) Anteproyecto de norma mexicana **PROY-NMX-F-735-COFOCALEC-2009**, Sistema producto lecha- Alimentos- Lácteos- Alimento lácteo regional- Queso Cotija artesanal madurado- Denominación, Especificaciones y métodos de prueba.
- (4) Aymerich, T., et. al., **Microbial Quality and Direct PCR Identification of Lactic Acid Bacteria and Nonpathogenic Staphylococci from Artisanal Low-Acid Sausages** (2003), Applied and environmental microbiology, Vol. 68, No. 8, 4583–4594.
- (5) Badui Dergal, Salvador, **Química de los alimentos**, Cuarta ed. (México, PEARSON Educación, 2006), 626-627
- (6) Balbás Paulina, **De la Biología Molecular a la Biotecnología**, Primera ed. (México, Ed. Trillas S.A. de C.V., 2002)194-198,
- (7) Beresford, T. P., et. al., **Recent advances in cheese microbiology** (2001), International Dairy Journal 11, 259-274.
- (8) Bernardeau, M., et. al., **Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus** (2008), International Journal of Food Microbiology 126, 278-285
- (9) Boyle, R. J., et. al., **Probiotic use in clinical practice: what are the risks?** (2006) The American Journal of Clinical Nutrition, 83, 1256-1264.
- (10) Bravo, Amanda. **Estudio de la poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas de Queso Cotija**, (México D. F., Tesis de licenciatura. Facultad de Química UNAM, 2008), 48, 129
- (11) Bruno, M.E.C. and Montville T.J., **Common Mechanistic Action of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria** (1993) Applied and Environmental Microbiology, Sept. 1993, 3003-3010.
- (12) Cailliez-Grimal Catherine, et. al. **Quantitative polymerase chain reaction used for the rapid detection of Carnobacterium species from French soft cheeses** (2005) FEMS Microbiology Letters 250, 163-169

-
-
- (13) Catálogo en línea de productos Millipore. Specifications **m-ColiBlue24[®] Broth**, <http://www.millipore.com/catalogue.nsf/docs/C3494>
- (14) Chagnaud, P., et. al., **Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common Lactobacillus species** (2001), Journal of Microbiological Methods 44, 139–148
- (15) De Freitas, I., et. al., **The addition of a cocktail of yeast species to Cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation** (2009), International Journal of Food Microbiology 129, 37-42.
- (16) Delgado Arciniega Estela, **Producción de compuestos antibacterianos por BAL aisladas de queso Cotija**. (Manuscrito no publicado, 2008) Proyecto LABDEA. Facultad de Química.
- (17) Delorme Christine, **Safety assessment of dairy microorganisms: Streptococcus thermophilus** (2008), International Journal of Food Microbiology
- (18) Doyle Michael P., Beuchat Larry R., Montville Thomas J., **Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers**, 2nd ed. (Washington, D.C., American Society for Microbiology (ASM), 2001), 76-77,80-81
- (19) Entrala, Carmen, (2000), **Técnicas de análisis del ADN en genética forense. Análisis por la reacción en cadena de la polimera (PCR)**, Laboratorio de ADN forense, Depto. de Medicina Legal, Universidad de Granada, España, publicado en línea en: <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/forensetec.htm#22>
- (20) Escalante, D. et. al., (2007). **Estudio de la distribución de las bacterias ácido lácticas en sedimentos costeros de la península de Yucatán**. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. SMBB. Morelia. 2007, CVI-28
- (21) Estrada, Cindy. **Comparación de técnicas para cuantificar microorganismos coliformes y determinación de la calidad microbiológica en quesos artesanales**, (Manuscrito no publicado, 2006), 38.
- (22) FAO/WHO, **Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation** (2006) FAO. Food and nutrition paper 85. [en línea] Publicado 2006 [Consultado Marzo 2009]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>
- (23) Fayol-Messaoudi, D., et. al., **pH-, Lactic Acid-, and Non-Lactic Acid-Dependent Activities of Probiotic Lactobacilli against Salmonella enterica Serovar Typhimurium** (2005) Applied and Environmental Microbiology, Oct. 2005, 6008–6013
-
-

-
-
- (24) Feng, Peter, Weagant, Stephen D., Grant, Michael A. Bacteriological Analytical Manual Online (2002), Ch. 4. **Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria**, publicado en línea en: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>
- (25) Fortina M. G., et. al., **Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese** (2003), Food Microbiology 20, 397-404
- (26) Fox, Patrick F., et. al., **Fundamentals of cheese Science**, (Gaithersburg Maryland, Ed. Aspen, 2000), 10-16, 62, 206-219, 226, 232.
- (27) Franciosi, E., et. al., **Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk** (2009), International Dairy Journal 19, 3-11.
- (28) García, B. E., et. al., **Efect of Lactococcus lactis UQ2 and its bacteriocin on Listeria monocytogenes biofilms** (2007), Food Control, 19, 670-680.
- (29) García, Verónica, **Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija**. (México D. F., Tesis de licenciatura. Facultad de Química UNAM, 2006), 7-10, 96.
- (30) Hernández, Nayeli, **Estudio de cepas proteolíticas aisladas de queso Cotija**, (México D. F., Tesis de licenciatura. Facultad de Química UNAM, 2006)
- (31) Hernández, Verónica, **Queso Cotija: Estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante**, (México D. F., Tesis de licenciatura. Facultad de Química UNAM, 2007), 10-13, 56
- (32) Horwitz, William, W. Latimer George W., **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 18th ed. (Association of Official Analytical Chemists, 2006), Ch. 17, 27-46
- (33) Irlinger, F. and Mounier, J., **Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety** (2009), Current Opinion in Biotechnology, 20, 1-7
- (34) Itoi, S., et. al., **Isolation of halotolerant Lactococcus lactis subs. lactis from intestinal tract of coastal fish** (2008), International Journal of Food Microbiology, 121, 116-121.
- (35) Kidd, K. K., Ruano, G. (1995). Optimizing PCR. En: **PCR 2. A practical approach**. McPherson, M. J., Hames, B. D. and Taylor, G.R. (U.S.A., Oxford University Press), 1-21.
-
-

-
-
- (36) Kirk, J. L., et. al., **Methods of studying soil microbial diversity** (2004), Journal of Microbiological Methods, 58, 169-188.
- (37) Klare, C., et. al., **Antimicrobial susceptibilities of Lactobacillus, Pediococcus and Lactococcus human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use** (2007) Journal of Antimicrobial Chemotherapy 59, 900-912
- (38) Lombardi, A., et. al., **Characterization of Streptococcus macedonicus strains isolated from artisanal Italian raw milk cheeses** (2004), International Dairy Journal 14, 967-976.
- (39) Madigan Michael T., Martinko John M., Parker Jack, **Brock. Biology of Microorganisms**, 11th ed. (N.Y, Prentice Hall, 2006), 156-157, 162, 172, 186-188, 374-375, 604-605, 617-618, 718-720, 980-981.
- (40) Mannu, L., Comunian, R., Scintu, M. F., **Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening** (2000), International Dairy Journal 10, 383-389.
- (41) Martínez, P. **Identificación de levaduras en el queso Cotija por métodos moleculares dependientes e independientes de cultivo (ARDRA, RFLP y DGGE).2009** (México D. F., Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM, 2009)
- (42) Maurer John, **PCR Methods in foods**, (U.S.A., Ed. Springer, 2006), 6-7, 28, 31-35.
- (43) Millipore Technical Publications. **m-ColiBlue24 Broth, PF196EN00**, [en línea] [Consultado en Mayo 2007]. Disponible en: <http://www.millipore.com/techpublications/tech1/pf196en00>
- (44) Monnet Christopher, et. al., **Quantitative Detection of Corynebacterium casei in Cheese by Real-Time PCR** (2006), Applied and environmental microbiology, Vol. 72, No. 11, 6972–6979
- (45) Nes, I. F., et. al., **Bacteriocin Diversity in Streptococcus and Enterococcus** (2007) Journal of Bacteriology, Feb. 2007, 1189-1198.
- (46) Norma Oficial Mexicana **NOM-092-SSA1-1994**, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- (47) Norma Oficial Mexicana **NOM-110-SSA1-1994**, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- (48) Norma Oficial Mexicana **NOM-111-SSA1-1994**, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
-
-

-
-
- (49) Norma Oficial Mexicana **NOM-112-SSA1-1994**, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable
- (50) Norma Oficial Mexicana **NOM-113-SSA1-1994**, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
- (51) Norma Oficial Mexicana **NOM-121-SSA1-1994**, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.
- (52) Norma Venezolana **COVENIN 3276:1997**, Alimentos. Recuento de coliformes *Escherichia coli*. Método en placa con películas secas rehidratables (Petrifilm)
- (53) Norma Venezolana **COVENIN 3822:2003**, Queso pasta hilada
- (54) Oger, Cécile, et. al. ***Estimation of the abundance of the cadmium resistance gene *cadA* in microbial communities in polluted estuary water*** (2001), Res. Microbiol. 152, 671–678
- (55) Ogier, J.C., Serror, P., ***Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus*** (2008), International Journal of Food Microbiology, 126, 291-301
- (56) Organización Mundial de la salud (OMS). ***Estrategia global de la OMS para la inocuidad de los alimentos: alimentos más sanos para una salud mejor***. OMS (2002) Publicado 2002 [Consultado Abril 2009]. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/general/global_strategy/en/
- (57) Poméon, Thomas, (2007), ***EL QUESO COTIJA, MÉXICO. Un producto con marca colectiva queso “Cotija Región de origen”, en proceso de adquisición de una Denominación de Origen***, Consultoría realizada para la FAO y el IICA en el marco de estudio conjunto sobre los productos de calidad vinculada al origen. [en línea] Publicado 2007 [Consultado Octubre 2008]. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/agn/agns/Projects_SQP_Santiago/Documentos/Estudios%20de%20caso/Cotija/Queso_COTIJA_Mexico.pdf>
- (58) Pu, Z. Y., Dobos, M., Limsowtin, G. K. Y., and Powell, I. B., ***Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus**** (2002), Journal of Applied Microbiology, 93, 353–361.
- (59) Roostita, R., Fleet, G. H., ***The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses*** (1996), International Journal of Food Microbiology, 28, 393-404.
-
-

- (60) Salminen, Seppo, Von Wright, Atte, ***Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects***, 2nd ed. (Marcel Dekker Inc., 1998), Ch. 1, 1-59, Ch. 5, 139-155, Ch. 7, 211-275.
- (61) Ward L.J.H. and Timmins M.J., ***Differentiation of Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei and Lactobacillus rhamnosus by polymerase chain reaction*** (1999) Letters in Applied Microbiology, 29, 90-92.
- (62) Woodford Neil and Johnson Alan P., ***Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications***, (Totowa, New Jersey, Ed. Humana Press, 1998), 63, 68.
- (63) Zúñiga, Berenice, ***Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por Métodos Moleculares*** (México D. F., Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM, 2009)