

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

***AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA FLORA
MICROBIANA PRESENTE EN EL QUESO DE PORO ORIGINARIO DEL ESTADO
DE TABASCO***

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

CINTHYA G. GUTIÉRREZ ZÚÑIGA

MÉXICO D.F.

2011



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: María Elena Cañizo Suarez

Vocal: María del Carmen Wacher Rodarte

Secretario: Judith Jiménez Guzmán

1er suplente: Norma Angélica Castellanos Chávez

2do suplente: Victor Hugo Blancas Morales

Lugar de realización del tema:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA

Asesora: Dra. Judith Jiménez Guzmán

Supervisor Técnico: Dr. Mariano García Garibay

Sustentante: Cinthya Gabriela Gutiérrez Zúñiga

Contenido	Página
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	9
Definición de queso	9
Proceso de elaboración del queso	10
Importancia de la lipólisis y proteólisis en la formación de la textura del queso	13
Formación de los ojos	15
Proceso de elaboración del queso de Poro	16
Análisis microbiológico	17
Métodos de identificación de microorganismos por métodos moleculares	18
PCR	19
Electroforesis de DNA en geles de agarosa	19
Secuenciación de DNA	21
OBJETIVOS	24
Objetivos Generales	24
Objetivos Particulares	24
METODOLOGÍA	24
Preparación de extractos de queso	24
Conteo de microorganismos en placa	25
Aislamiento y purificación de los microorganismos del queso de poro	26
Pruebas de actividad metabólica	27
Identificación de los microorganismos aislados (PCR)	27
Extracción de DNA	27

PCR	30
Secuenciación del DNA	34
RESULTADOS Y DISCUSION	35
Conteo en placa de microorganismos coliformes y de hongos y levaduras	37
Características de los microorganismos aislados	40
Actividad metabólica	45
Identificación de los microorganismos aislados	49
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES	61
REFERENCIAS	62
ANEXO I	66
ANEXO II	69

RESUMEN

En la actualidad el estudio de productos artesanales es un tema de modernidad debido a que puede traer muchos beneficios en cuanto a la estandarización del proceso de elaboración de los mismos, así como para tener una mejor y mayor comercialización de dichos productos, éste es el caso del queso de poro originario del estado de Tabasco.

Por medio del estudio de la flora microbiana presente en el queso de poro es que pudimos conocer el tipo de microorganismos que podrían ser responsables de las características fisicoquímicas y sensoriales del queso así como otros que sólo son parte de la población del queso debido a que son típicos de la región. Esto se llevó a cabo al hacer un aislamiento y purificación de los microorganismos presentes en el queso al sembrar en medios diferenciales los extractos de queso preparados a partir de 7 piezas de diferentes marcas. Así como determinar pruebas de actividad metabólica (proteólisis, lipólisis y generación de gas) y la identificación de los microorganismos aislados por métodos de biología molecular.

Se logró aislar un total de 54 cepas de las cuales se identificaron 52, las pruebas de actividad metabólica demostraron que la población predominante en el Queso de Poro son las bacterias mientras que las levaduras aisladas fueron los únicos microorganismos que presentaron actividad de formación de gas positiva. *Issatchenkia orientallis* y *Bacillus sp.* fueron los microorganismos que se encontraron en todas las piezas de queso así como en mayor proporción con respecto a los demás, lo que nos puede indicar que estos microorganismos tienen una contribución importante en la formación de las características del Queso de Poro y/o a su vez pueden ser microorganismos típicos de la flora de la región. Las bacterias por otro lado, presentaron actividad proteolítica y lipolítica, por lo que podrían contribuir al desarrollo del sabor y aroma del queso.

La mayoría de los microorganismos que se pudieron identificar han sido aislados de productos lácteos, por lo que pueden ser propuestos para un inóculo en la elaboración de un producto tipo de Queso de Poro, solo teniendo un control adecuado de la carga microbiana final en el producto para cumplir con las legislaciones y mejorar la comercialización de dicho producto.

INTRODUCCIÓN

El “Queso de Poro” o queso de Balancán es un queso típico originario del Estado de Tabasco elaborado en forma artesanal con leche cruda o bronca, inoculado con suero del mismo queso de la producción del día anterior fermentado espontáneamente, y oreado durante una semana. El producto terminado se recubre con parafina. El queso tiene un sabor muy ácido, un aroma intenso y característico, y desarrolla en el interior de la pasta pequeños hoyos o poros por la producción y acumulación de gas generado por la microbiota.

El queso de poro, debido a que se elabora con leche bronca, a la forma de inoculación y a juzgar por las características ya descritas, debe contener una flora microbiana muy diversa, la cual debe influir en forma considerable al desarrollo de sus características organolépticas particulares, pero muy probablemente representa también un riesgo para la salud ante la eventual presencia de microorganismos responsables de toxiinfecciones alimentarias (microorganismos patógenos y productores de toxinas).

Por sus características organolépticas distintivas, este queso podría ser único y original a nivel mundial, por lo que su explotación fuera del Estado e incluso en el extranjero ofrecería a los productores mejores condiciones de comercialización. Para adquirir un mayor valor agregado y un nicho exclusivo de mercado, es importante que este queso ostente al menos una marca colectiva, y de preferencia una denominación de origen.

Este proyecto tiene como objetivo el estudio de la microflora presente en el Queso de Poro para así conocer los microorganismos responsables de las características propias del queso. Para poder estudiar la interacción de los microorganismos con los componentes de la leche se determinará su actividad metabólica (lipólisis, proteólisis y formación de gas) ya que esta es

de suma importancia en la elaboración de un queso artesanal. Así mismo al tener el tipo de microorganismo de que se trata, debido a su identificación por métodos de biología molecular y conocer su posible aportación en el proceso, se puede proponer un inóculo a partir de los microorganismos aislados para poder llevar a cabo un ensayo con leche pasteurizada reduciendo así el riesgo de la presencia de microorganismos patógenos. Al final se tendría un producto tipo queso de poro, que además de garantizar una inocuidad le traería beneficios en cuanto a su vida de anaquel y como ya fue mencionado antes, su distribución y comercialización.

ANTECEDENTES

Definición de Queso

Se cree que el queso se desarrolló en Iraq hace unos 8000 años, probablemente al intentar almacenar leche durante periodos prolongados. La producción y los tipos de quesos que se elaboran han evolucionado y se han diversificado a través del tiempo pero durante largos períodos fue más bien un arte que un proceso científico. Las diferencias de las variedades resultan de las modificaciones que se introducen en una o más etapas básicas del proceso de elaboración. La normalización de las etapas del proceso para obtener variedades con características estables comenzó a aplicarse en el siglo XIX (Scott, 1998). Sin embargo, incluso actualmente se observan variaciones dentro del mismo tipo de queso, dependiendo del fabricante, del origen y del tipo de leche utilizada (ICMSF, 1998).

Los quesos son una forma de conservación de los dos componentes insolubles de la leche: la caseína y la materia grasa; se obtiene por coagulación de la leche seguida del desuerado en el curso del cual el lactosuero se separa de la cuajada. El lactosuero contiene la mayor parte del agua y de los componentes solubles de la leche, quedando una pequeña parte aprisionada en la cuajada. La definición legal del queso precisa que “el producto puede estar o no fermentado”; de hecho experimenta por lo menos una fermentación láctica.

El queso es un alimento universal, que se produce en casi todas las regiones del globo a partir de leche de diversas especies de mamíferos. Los quesos se encuentran entre los mejores alimentos del hombre no solamente en razón de su alto valor nutritivo (materias nitrogenadas bajo diferentes formas, materias grasas, calcio, fósforo, etc.), sino también por las cualidades organolépticas extremadamente variadas que poseen, ya que la variedad es fuente de placer (Alais,1985).

Proceso de elaboración del queso

Antes que considerar las técnicas de fabricación hay otros factores de suma importancia que tienen influencia en el producto terminado, además de considerar el tipo de leche utilizada.

- Factores microbiológicos: composición de la microflora considerada bajo un aspecto dinámico, microfloras asociadas y microfloras sucesivas.
- Factores bioquímicos: concentración y propiedades de las enzimas coagulantes, principalmente, del cuajo, de las bacterias, de las levaduras y de los mohos.
- Factores físicos y fisicoquímicos: temperatura, pH y efectos osmóticos.
- Factores químicos: proporción de calcio retenido en la cuajada, contenido en agua y sal, composición de la atmósfera (humedad, gas carbónico, amoníaco).

Factores mecánicos: corte, agitación, trituración y frotamiento, que reducen o acentúan los efectos de los factores precedentes (Alais, 1985).

El proceso de elaboración puede dividirse en varias etapas:

- Transformación mediante acidificación de la leche, cruda o tratada térmicamente, en cuajada;

El uso de la leche de gran calidad, tanto química como microbiológica, es de gran importancia para la elaboración de queso de buena calidad. Durante muchos años la acidificación se realizaba permitiendo el crecimiento de la microbiota autóctona. Sin embargo, debido a los resultados poco consistentes y para evitar efectos no deseables,

como la producción de aromas anómalos o gas, se seleccionaron cultivos iniciadores específicos que son los que hoy en día se utilizan. La calidad y tipo de cultivo iniciador y la forma en la que se añade depende del tipo de queso que se pretenda fabricar.

Se utilizan cultivos iniciadores secundarios, levaduras y mohos, cuando se pretende impartir alguna característica especial que caracteriza a cierta variedad de queso.

- Coagulación;

La coagulación de la fracción caseínica de la leche consiste en la formación de un gel acuoso debido a una débil proteólisis o a una acidificación a un pH de alrededor de 4.6 o >a 4.6 en combinación con un calentamiento. La producción de ácido influye en diversas características de la cuajada; entre ellas, la actividad, desnaturalización y retención del agente coagulante, la fuerza de la cuajada y por tanto, el rendimiento, sinéresis del gel, disolución del fosfato de calcio, propiedades reológicas y crecimiento de bacterias no deseables, en particular las patógenas.

- Deshidratación;

Tras el corte del gel en pequeñas piezas (1-2 cm³), se produce la sinéresis y el suero se expulsa en una cuantía que depende de la composición de la leche, pH del suero, temperatura de cocción y velocidad y tiempo de agitación. Este paso es importante para las características finales del producto, cuyos parámetros puede modificar el fabricante (Walstra, 1993).

- Moldeado y salado.

La fuerza y la presión que se aplica dependen de la variedad de queso que se pretende fabricar por lo tanto el moldeado está directamente relacionado con éstos. La última

operación es el salado (antes o después del moldeado y prensado). La adición de cloruro sódico tiene diversos efectos; entre ellos, controla el crecimiento y metabolismo microbiano, controla las actividades enzimáticas e influye en la textura. En general las etapas iniciales son comunes en la elaboración del queso pero las fases como el salado, el moldeado y la maduración son diferentes para distintos tipos (Fox et al, 2000).

- Maduración (en algunos casos)

En México diversos quesos se consumen frescos, constituyendo una parte importante del consumo total, pero la mayoría de las variedades se someten a maduración. Durante esta fase se pierde agua y se producen complejas reacciones bioquímicas como resultado de las enzimas naturales de la leche (en el caso de usar leche sin proceso de pasteurización), las bacterias de cultivo iniciador y los microorganismos secundarios y sus enzimas. Estos cambios bioquímicos favorecen el desarrollo de la textura, sabor y aroma característicos (ICMSF, 1998).

Generalmente, la cuajada recién obtenida presenta una textura firme, que va modificándose lentamente por efecto de la proteólisis de las enzimas de los microorganismos presentes en la maduración, hasta obtener una textura más blanda y suave en el queso madurado. Los compuestos que se generan en la proteólisis, intervienen además en el desarrollo del aroma y sabor típicos de cada variedad.

Mientras que la coagulación de la leche se debe a la acción de la quimosina sobre la caseína κ , la hidrólisis de las proteínas durante el proceso de maduración depende de la actividad de varias enzimas proteolíticas y peptidásticas de distintas procedencias. Las principales fuentes de enzimas proteolíticas son el cuajo empleado para coagular la leche, las peptidasas de los cultivos incorporados para acidificar la leche, las proteasas naturales de la leche, como la plasmina y la

catepsina D, las exoenzimas producidas por las bacterias psicrótrofas durante el almacenamiento de la leche en refrigeración y las enzimas secretadas por las bacterias lácticas contaminantes.

La proteólisis que tiene lugar durante la maduración del queso, implica en primer lugar la conversión de las caseínas en péptidos de gran tamaño. A continuación estos péptidos son hidrolizados en productos de masas moleculares más pequeñas. La proteólisis primaria en el queso ha sido definida (Grappin et al., 1985) como los cambios en las caseínas α_s, β y γ , que pueden detectarse por electroforesis en gel de poliacrilamida. Los productos de la proteólisis secundaria son péptidos y aminoácidos solubles en la fase acuosa del queso (Early, 1998).

El proceso proteolítico en la maduración de los quesos es importante porque:

- Contribuye directamente o indirectamente en el olor del queso
- Potencia el sabor, ya que se liberan sustancias sápidas durante la masticación.
- Contribuye a la ruptura de la red proteica de la cuajada (solubiliza la proteína)
- En ocasiones, es causa del desarrollo de características no deseadas (coloraciones marrones, formación de cristales y sabores amargos)

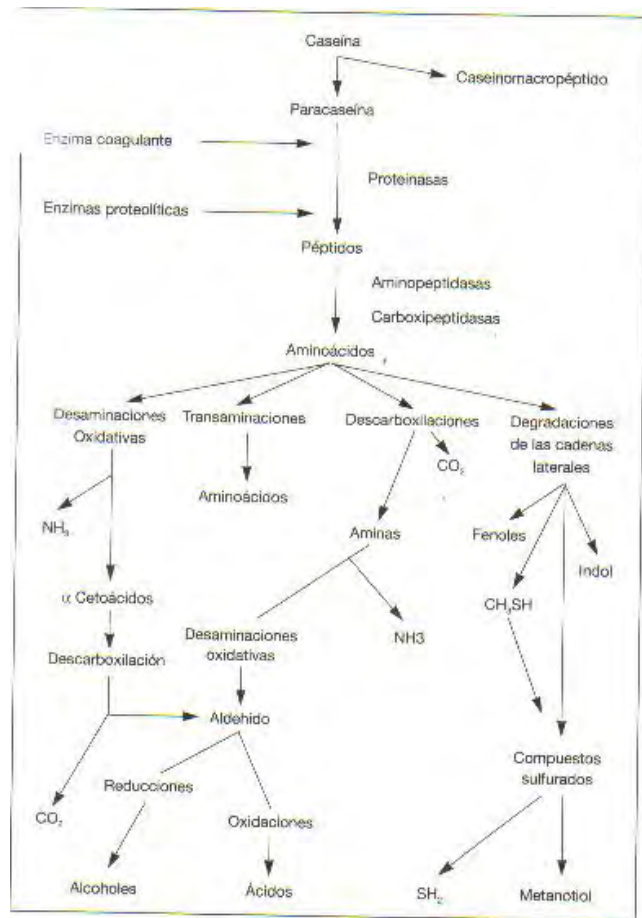


Imagen 1 Degradación de la caseína, proteína mayoritaria de la leche (Chamorro, 2002)

Durante la maduración, la paracaseína se descompone en compuestos nitrogenados más simples. En primer lugar, se degrada a péptidos que, por aminopeptidasas y carboxipeptidasas se escinden en sus aminoácidos constituyentes. Éstos contribuyen al conjunto olfato-gustativo básico del queso, sobre todo aquellos que poseen un sabor amargo. Los aminoácidos desarrollan en el paladar una primera sensación gustativa, pero el regusto final puede ser diferente (Chamorro,2002).

La actividad lipolítica de los microorganismos también es de suma importancia ya que en algunos casos en donde se añaden microorganismos específicos como es el caso de *Geotrichum candidum* contribuye a la formación del aroma.

La lipólisis de los componentes grasos del queso en el proceso de maduración es de importancia para el desarrollo del sabor debido a que:

- Es un disolvente de los componentes del olor, que modifican sus umbrales de percepción.

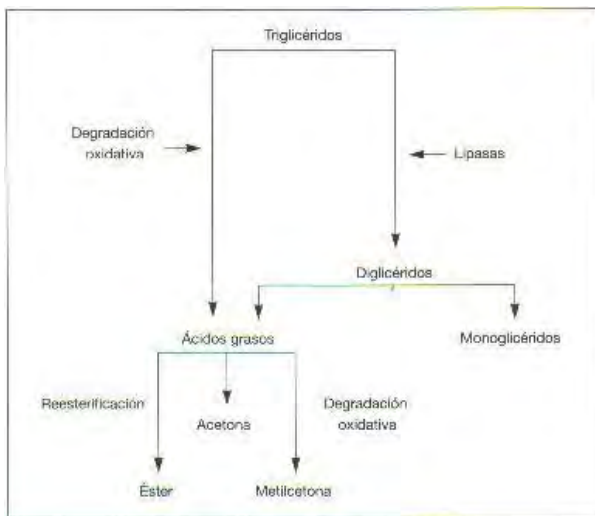


Imagen 2 Descomposición de la grasa presente en el queso durante el proceso de maduración (Chamorro, 2002)

- Interviene en los equilibrios que existen entre las formas disociadas y no disociadas de los ácidos grasos.

En el queso hay ácidos grasos libres, unos estaban ya en la leche recién ordeñada y otros son consecuencia de la lipólisis, que ha podido sufrir la materia grasa mientras estaba en la leche o posteriormente en el queso.

Como resultado de la hidrólisis de los

triglicéridos (Imagen N°2), se obtendrá por cada molécula de triglicérido una molécula de glicerol y tres ácidos grasos libres. Los agentes responsables de la lipólisis son las lipasas propias de la leche cruda, las del coagulante (esterasas pregátricas), las bacterianas y las de levaduras y mohos.

Ahora bien el principal papel de la lipólisis, aún en los quesos en que ésta es pequeña, es el de formar compuestos (ácidos grasos y sus productos derivados) que contribuyan a formar el conjunto olfato-gustativo.

A medida que progresa la lipólisis de la materia grasa, aumenta la concentración de ácidos grasos libres, lo que produce un gusto rancio o jabonoso, que en algunos casos puede ser un efecto deseado (Chamorro, 2002).

La formación de ojos

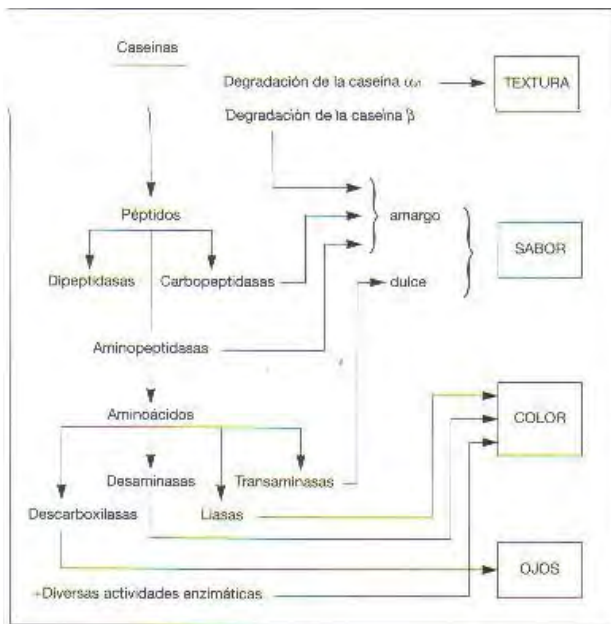


Imagen 3 Influencia de la descomposición de la caseína en las características finales del queso (Chamorro, 2002)

Durante la maduración se genera amoníaco, anhídrido carbónico y una pequeña parte de hidrógeno; una parte de éstos es absorbida por la masa del queso y otra pasa a ocupar los pequeños espacios que quedan entre los granos de cuajada. El aspecto que el queso ofrece al corte guarda relación con el número, forma y tamaño y distribución de los ojos, y es en función de la cantidad de gases formados (Imagen 3). Los gases se acumulan en las cavidades ya existentes o

en las zonas en las que la masa de queso está menos trabajada. El anhídrido carbónico procede principalmente de la fermentación propiónica. En los quesos de pequeño formato la fermentación

láctica se caracteriza por la formación de anhídrido carbónico e hidrógeno, que producen ojos abundantes e irregulares, cuyo número y tamaño dependen de la velocidad a la que se producen los gases: son más numerosos y más pequeños cuanto más rápida sea la formación de gas, y menos numerosos, pero mayores en el caso contrario. (Dilanjan, 1944).

Proceso de elaboración del queso de Poro

El queso de Poro es un queso fresco, o ligeramente madurado, elaborado con leche cruda de vaca, entera. Popularmente se le conoce como Queso de Poro, ya que durante su maduración se forman unos pequeños poros en la pasta del queso. A menudo experimenta una maduración involuntaria adicional por tardarse su distribución y comercialización. (Cervantes, 2006)

Se presenta al mercado en piezas pequeñas, con un peso que oscila entre 150 y 1kg. Las piezas vienen parafinadas (con parafina transparente) y envueltas en papel amarillo, bajo el cual luce su etiqueta.

El queso de Poro es un producto meramente regional que se elabora en la zona de los ríos del estado de Tabasco; concretamente en los municipios de Balancán y Tenosique. En su fabricación se emplean leche de ganado cruzado cebú-pardo suizo.

Los pasos notables en la elaboración del queso son:

1. Adición del suero (ácido) sin refrigeración del día anterior a la leche cruda, como inóculo.
2. Se lleva a cabo el cuajado enzimático.
3. Una vez formado el coágulo, éste se corta.

4. Se desuera y se sala.
5. El moldeado se efectúa en moldes de madera rectangulares, durante 3 días.
6. El prensado se lleva a cabo empleando prensas rústicas de madera resistente o piedras, aquí el queso tarda una semana en la cual comienza la maduración del producto. Durante esta semana el queso se hincha y desborda y los sobrantes se cortan.
7. El salado lo lleva a cabo una sola persona, pieza por pieza durante 5 días repetidamente.
8. El parafinado se lleva a cabo sumergiendo las piezas de queso, previamente lavadas y oreadas, en un baño de parafina blanca fundida. El objeto es formar una barrera contra la deshidratación del producto y la invasión de mohos. Una vez parafinado, el queso de madura una semana más.
9. Se empaca ya parafinado, se envuelve en papel celofán amarillo debajo del cual se coloca una etiqueta de identificación comercial.
10. Por último el queso de Poro se distribuye.

Se comercializa a los pocos días de producido; sin embargo por problemas de distribución puede ocurrir que su venta se retarde varias semanas, durante ese tiempo la pasta del queso continúa un proceso de maduración, hasta llegar al consumidor. (Cervantes, 2006)

Análisis microbiológico

Los quesos de pasta dura y prensada tradicionales son productos ácidos y con bajo contenido en humedad, que no resulta el medio adecuado para el desarrollo de la mayor parte de los microorganismos alterantes. El problema microbiológico más frecuente en estos quesos es el desarrollo de mohos superficiales. Los mohos y levaduras son muy abundantes en el entorno de las plantas de quesería, especialmente en las de elaboración artesanal (Early, 1998).

El principal objetivo de los análisis microbiológicos de la leche y productos lácteos es garantizar su seguridad para el consumo, es decir, que no contengan microorganismos patógenos. También es importante que los productos sean de la mejor calidad higiénica y se conserven durante el máximo tiempo posible. Para cumplir estos requisitos se realizan análisis microbiológicos sobre el producto final. Los medios selectivos contienen uno o más compuestos que son inhibidores para la mayoría de organismos pero que lo son significativamente menos para la especie o grupo de especies, que es necesario aislar. Se debe advertir que, por estar basados en la presencia de reactivos inhibidores, generalmente serán inhibidores, hasta cierto punto para los microorganismos que tienen que seleccionar (Adams y Moss, 1995)

Identificación Molecular

La identificación molecular se plantea como una moderna alternativa a los procedimientos morfofisiológicos clásicos. En la actualidad, hay una gran variedad de métodos para distinguir entre miembros de una misma familia, entre los que se encuentran las técnicas basadas en la biología molecular. Entre éstas, las técnicas más empleadas están basadas en la variación genómica debida a la evolución y normalmente se enfoca al estudio de genes que sirven como “cronómetros evolutivos”. El análisis de la secuencia de ADN de los genes que codifican para los ARN ribosomales es el método más extendido, siendo también de mucho interés el análisis de la secuencia de nucleótidos de las llamadas ITS (*Internal Transcribed Spacers*), que flanquean al gen

para el ARN ribosomal 5.8S. La región ITS1 se localiza entre los genes para los ARN ribosomales 18S y 5.8S y la ITS2 entre los genes para los ARN ribosomales 5.8S y 28S. Estas secuencias ITS permiten un mayor grado de discriminación que los propios genes para los ARN ribosomales, al presentar una mayor tasa de variabilidad por no ser regiones codificantes.

En el caso de las bacterias, se ha utilizado tradicionalmente el gen para el ARNr 16S con el propósito de establecer relaciones filogenéticas entre grupos (Hughes, M.2007).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que ha revolucionado el modo de manipular, clonar y detectar fragmentos de DNA ya que se ha convertido en una de las técnicas básicas de Biología Molecular ampliamente utilizada debido a su rapidez, especificidad, flexibilidad y aplicabilidad.

La PCR parte de la premisa de que el ADN bicatenario puede desnaturalizarse, de manera que ahora en cada una de sus hebras pueden alinearse unos oligonucleótidos diseñados para ser complementarios a porciones de cada una de las cadenas. Cuando estos oligonucleótidos se sitúan en extremos opuestos de una región en particular, pueden servir como cebadores para una de DNA polimerasa, lo que permite formar una porción de DNA bicatenario definida por estos dos cebadores. La repetición de los ciclos de desnaturalización, alineamiento (hibridación) y polimerización es capaz de producir cantidades crecientes del producto, resultando una amplificación de orden exponencial de la secuencia enmarcada por los cebadores. Por lo tanto, bastaría una cantidad muy pequeña de DNA molde para obtener una gran masa tras la PCR; de hecho se ha utilizado para amplificar un gen partiendo de una única célula, o lo que es lo mismo, de una única molécula de DNA molde. (Claros, G. et al. 2001)

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Fundamento teórico

Las moléculas de ácidos nucleicos, debido a la carga negativa proporcionada por los fosfatos a pH fisiológico, se mueven hacia el ánodo (polo positivo) cuando están expuestos a un campo eléctrico a una velocidad constante determinada por el balance entre la fuerza eléctrica y el rozamiento con el medio.

La concentración de la agarosa en el gel es la que va a determinar el tamaño de poro del mismo (150nm en un gel al 1%) y por lo tanto el poder de resolución. No hay que confundir resolución con separación puesto que si bien los geles de agarosa tienen gran capacidad de separación al ser capaces de separar bandas desde 200 a 50000 nucleótidos, tienen poco poder de resolución ya que no discriminan entre bandas de masa molecular próxima.

Visualización

Aunque los ácidos nucleicos absorben en el UV, no emiten ninguna luz visible. Además, las cantidades que se manejan habitualmente no crean suficiente "sombra" como para poderlos observar directamente, por lo que es necesario teñirlo. Para ello se utiliza el bromuro de etidio, agente que se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos, de manera que la luz ultravioleta a 254nm se absorbe por el DNA y se transmite al bromuro de etidio que absorbe entre 302 y 366nm, y todas estas radiaciones se emiten como fluorescencia a 590 nm (rojo anaranjado). La ventaja del bromuro de etidio es que su fluorescencia se ve incrementada 25 veces cuando se intercala en ácidos nucleicos bicatenarios, mientras que no varía mucho cuando está libre o asociado a ácidos nucleicos monocatenarios. Por otra parte la incorporación del bromuro de etidio al DNA provoca que un desenrollamiento, lo que lleva a un aumento de la longitud en las

moléculas de DNA y la formación de superhélices compensatorias en los DNA circulares. Así el DNA lineal incorpora mucho más bromuro de etidio que el circular.

Utilizando este tipo de geles se puede calcular la concentración aproximada de un DNA cortado por enzimas de restricción. También se puede determinar si el ADN está intacto o ha sufrido degradación, en cuyo caso aparecerá una estela borrosa (*smear*) a partir del tamaño esperado hacia abajo como una amplia banda borrosa que corre cerca del frente electroforético.

El resultado de un gel teñido con bromuro de etidio puede ser fácilmente fotografiado con una película de autorevelado o mediante la captación de la imagen por una cámara de video con salida a una impresora de papel térmico (Claros, G. et al. 2001).

Secuenciación de DNA

Existen dos métodos utilizables indistintamente para ordenar fragmentos largos de ADN: el método de *Sanger* y el de *Maxam y Gilbert*. Aunque difieren en algunos aspectos químicos, ambos se basan en el mismo principio, la generación de fragmentos de ADN con un punto común de iniciación pero con terminales variables (fragmentos encadenados). La secuencia se infiere con gran precisión una vez determinada su longitud exacta.

Para determinar la secuencia de bases de un segmento de DNA, es preciso obtener un número grande de copias idénticas. Si la molécula que contiene la secuencia es relativamente pequeña es factible averiguar el orden de la molécula completa. En tal caso sólo es necesario separar la molécula del ácido nucleico contaminante. Si la secuencia forma parte de una molécula mucho más grande el procedimiento normal es clonar el segmento deseado y ver el orden de un fragmento de restricción purificado del ADN clonado. Puesto que el método de Sanger utiliza

ADN uncatenario, es preciso que el segmento sea digerido con una nucleasa para convertirlo en ADN uncatenario o, preferiblemente clonado en un vector uncatenario para empezar con él.

La determinación del orden de fragmentos purificados de una sola cadena se consigue generando una serie de fragmentos encadenados de ADN incubando el fragmento de con ADN polimerasa, una secuencia cebadora corta complementaria a una región del fragmento (a menudo un fragmento de restricción corto), los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (uno o más de los cuales es radiactiva), y una pequeña cantidad de un didesoxinucleósido trifosfato. La incorporación de didesoxitimidina, que carece de un grupo 3'-hidroxilo, finaliza la polimerización en ese punto.

Tras un periodo adecuado de incubación, la mezcla contendrá cadenas de ADN radioactivo de longitud variable. Del número de clases de moléculas ADN que difieren de una a otra en longitud, depende del número de restos timidina, ya que para cada uno de ellos en la nueva cadena habrá una familia de moléculas de ADN radiactivo que terminará en ese punto.

En la práctica se realizan cuatro incubaciones paralelas idénticas excepto que cada una contiene un didesoxinucleósido trifosfato diferente y, de aquí, que termine en una base distinta. Después se desnatura la mezcla y se somete a electroforesis para efectuar una separación por tamaños de las cadenas recién sintetizadas. La posición de las bandas radiactivas sobre el gel se observa presionando el gel sobre una película de rayos X que es expuesta a degradación radiactiva localizada del radioisótopo incorporado al ADN. En el revelado la película muestra una serie de bandas expuestas, cada una de las cuales corresponde a una clase de tamaño de ADN uncatenario. La secuencia se puede inferir directamente de ese autorradiograma; el fragmento más corto estará en la mezcla de incubación que contenga el análogo didedoxi de la primera base después del cebador, el siguiente fragmento más corto estará en la mezcla que contenga en

análogo didesoxi de la segunda base después del cebador; y así sucesivamente para los cientos de bases (Innis M, Gelfand, 1999)

Existen nuevas técnicas basadas en la electroforesis capilar que permiten una mejor automatización del proceso: las muestras se preparan manualmente y se depositan automáticamente en el capilar ya preparado, con lo que ya no es necesario preparar geles de acrilamida. Los secuenciadores automáticos pueden analizar en pocas horas hasta 96 muestras diferentes. Por otra parte, la reacción misma puede realizarse de manera automatizada gracias a sistemas robotizados conectados a aparatos de PCR (Tagu, D.).

OBJETIVOS GENERALES

Aislar y caracterizar la flora microbiana presente en el queso de Poro originario del estado de Tabasco.

OBJETIVOS PARTICULARES

Aislar e identificar los tipos de microorganismos presentes en el queso de poro

Conocer mediante pruebas de actividad metabólica en los microorganismos que se aíslan

Determinar la identificación de las cepas aisladas por métodos de biología molecular

METODOLOGÍA

Preparación de los extractos de queso

- Se pesaron 10g de cada queso en una bolsa Ziploc®, después se le agregaron 90 mL de agua peptonada estéril. Esta mezcla se homogeneizó en el stomacher durante 2 minutos a una velocidad normal.
- De esta suspensión anterior se hicieron diluciones decimales hasta llegar a 10^{-7} .

Conteo de microorganismos en placa

Cuantificación de hongos y levaduras

- A partir de la dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-7} se tomaron 5 μ L con una micropipeta de cada dilución y fueron colocados en un cuadrante de una caja petri con medio PDA (BD Bioxon, México) estéril. Este paso se realizó por triplicado
- Las cajas fueron incubadas 24 h a 37°C

- Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las colonias correspondientes a cada dilución y se realizaron los cálculos correspondientes para determinar la cantidad de hongos y levaduras presentes por gramo de muestra.

Cuantificación de coliformes totales

- A partir de la dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-7} se tomaron 5 μ L con una micropipeta de cada dilución y fueron colocados en un cuadrante de una caja petri con medio EMB (BD Bioxon, México) estéril. Este paso se realizó por triplicado
- Las cajas fueron incubadas 24 h a 37°C
- Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las colonias correspondientes a cada dilución y se realizaron los cálculos correspondientes para determinar la cantidad de UFC presentes por gramo de muestra.

Cuantificación de bacterias lácticas

- A partir de la dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-7} se tomaron 5 μ L con una micropipeta de cada dilución y fueron colocados en un cuadrante de una caja petri con agar MRS (Difco, USA) estéril. Este paso se realizó por triplicado
- Las cajas fueron incubadas 24 h a 37°C
- Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las colonias correspondientes a cada dilución y se realizaron los cálculos correspondientes para determinar la cantidad de UFC presentes por gramo de muestra.

Cuantificación de mesófilos aerobios

- A partir de la dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-7} se tomaron 5 μ L con una micropipeta de cada dilución y fueron colocados en un cuadrante de una caja petri con agar nutritivo (Dibico, México) estéril. Este paso se realizó por triplicado
- Las cajas fueron incubadas 24 h a 37°C
- Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las colonias correspondientes a cada dilución y se realizaron los cálculos correspondientes para determinar la cantidad de UFC presentes por gramo de muestra.

Aislamiento y purificación de los microorganismos

De las cepas resultantes en la parte de cuantificación de microorganismos se seleccionaron todas aquellas con características diferentes aparentes y se sembraron en tubos con medio estéril igual al del que provenían.

- A cada cepa se le realizó una tinción, azul de metileno para las levaduras y de Gram para las bacterias para determinar la pureza de la cepa.
- Para las cepas no puras se empleó la técnica de Miles y Misra, sembrando en una caja con medio estéril del que provenía la cepa.

Pruebas de Actividad Metabólica

- Actividad Proteolítica

Las cepas puras se sembraron por picadura en agar leche¹. Se incubaron a 37°C por 7 días. Con revisión periódica cada 2 días. Se tomó como positiva la prueba cuando se presentó alrededor de cada colonia un halo translúcido.

- Actividad Lipolítica

¹ Preparación de reactivos Anexo I

Las cepas puras se sembraron por picadura en agar tributirina². Se incubaron a 37°C por 7 días. Con revisión periódica cada 2 días. Se tomó como positiva la prueba al presentarse alrededor de cada colonia un halo translucido.

- Formación de gas

Las cepas puras se sembraron por asada en tubos con caldo nutritivo que contaban en su interior con una campana Durham. Se incubaron a 37°C por 2 días. Se tomó como positiva la prueba al notarse a simple vista burbujas de gas atrapadas en la campana.

Identificación de los microorganismos aislados (PCR)

Extracción de DNA

La extracción de DNA genómico total se realizó mediante el empleo del Kit Wizard™, DNA Purification Kit (Promega, USA), la técnica empleada conforme el manual técnico correspondiente es la siguiente:

Metodología para bacterias³

1. Las bacterias que se encontraban puras fueron inoculadas por asada en 10 mL de caldo nutritivo (las provenientes de agar AN y EMB) o caldo MRS (las provenientes de agar MRS).
2. Se tomó un mL del cultivo y se colocó en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL estériles, homogeneizando el tubo con cultivo antes de tomar la muestra. Se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos. Se desechó el sobrenadante.
3. Se resuspendieron las células en 480 µL de EDTA 50 mM.
4. Posteriormente se le adicionaron 120µL de solución de lizozima (10 mg /mL). Y se mezcló el contenido.

² Preparación de reactivos Anexo I

³ Materiales y reactivos adicionales ver Anexo I

5. Se incubó la muestra a 37°C por 60 minutos en un baño de agua. Posteriormente se centrifugó a 14000 por 2 minutos. Se desechó el sobrenadante.
6. Se le agregó a la muestra 600µL de solución de lisis de núcleo, se pipeteó para mezclar.
7. Las muestras se incubaron a 80 °C por 5 minutos para lisar las células. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente.
8. Se le adicionó a la muestra 3 µL de solución de RNasa. Invirtiendo el tubo de 2 a 5 veces para mezclar.
9. Se incubaron las muestras a 37°C por 60 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.
10. Posteriormente se le adicionaron 200 µL de solución de precipitación de proteínas. Los tubos fueron agitados con vortex por 20 segundos.
11. La muestra se incubó en hielo por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 3 minutos.
12. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio que contenía 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló por inversión hasta obtener una masa visible de ADN.
13. La muestra se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos.
14. Se drenó el sobrenadante y se secó con un papel absorbente y se le agregaron 600 µL de etanol al 70% a temperatura ambiente, y se pipeteó para mezclar.
15. Se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos. Cuidadosamente se aspiró el etanol.
16. Se dejó secar el pelet por 10 a 15 minutos. Se le adicionó 100 µL de solución rehidratante de DNA. Las muestras fueron almacenadas a 4°C por 24 h antes de su uso.

Metodología para levaduras⁴

1. Las levaduras una vez purificadas fueron inoculadas por asada en 10 mL de medio PMY.

⁴ Materiales y reactivos adicionales ver Anexo I

2. Se tomó un mL del cultivo y se colocó en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL estériles, homogeneizando el tubo con cultivo antes de tomar la muestra.
3. Se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos. Se desechó el sobrenadante.
4. Se resuspendieron las células en 293 μ L de EDTA 50 mM.
5. Posteriormente se le adicionaron 7.5 μ L de solución de liticasa (40 mg /mL). Y se pipeteó para mezclar.
6. Se incubó la muestra a 37°C por 60 minutos en un baño de agua. Posteriormente se centrifugó a 14000 por 2 minutos. Se desechó el sobrenadante.
7. Se le agregó a la muestra 300 μ L de solución de nucleasa, se mezcló el contenido.
8. Posteriormente se le adicionaron 100 μ L de solución de precipitación de proteínas. Los tubos fueron agitados con vortex por 20 segundos.
9. La muestra se incubó en hielo por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 3 minutos.
10. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio que contenía 300 μ L de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló por inversión hasta obtener una masa visible de ADN.
11. La muestra se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos.
12. Se drenó el sobrenadante y se secó con un papel absorbente los bordes del tubo y se le agregaron 300 μ L de etanol al 70% a temperatura ambiente, y se pipeteó para mezclar.
13. Se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos. Cuidadosamente se aspiró el etanol. Se dejó secar el pelet por 10 a 15 minutos.
14. Se le adicionaron 50 μ L de solución rehidratante de DNA.
15. Se le adicionó a la muestra 1.5 μ L de solución de RNasa. Invertiendo el tubo de 2 a 5 veces para mezclar. Y se incubó 15 minutos a 37°C.
16. Las muestras fueron almacenadas a 4°C por 24 hrs antes de su uso.

Después de haber extraído el DNA de las cepas aisladas se confirmó la presencia de éste por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%

Tabla 1. Condiciones de electroforesis en gel de agarosa al 1% con un voltaje de 84 V.

Volumen de los componentes de la electroforesis en gel de agarosa para separar DNA y los productos de PCR de bacterias y levaduras.

COMPONENTE	VOLUMEN (µL)
Muestra de DNA o producto de PCR o marcador (Promega,USA)	5
Tampón de carga ⁵ (Promega,USA)	2
H ₂ O estéril	13
Volumen final	20

Después del tiempo requerido para llevar a cabo la electroforesis, se tiñó el gel con bromuro de etidio durante 15 minutos y se visualizó irradiando con luz UV, para lo cual se empleó un equipo de fotodocumentación GelDoc 2000(Bio-Rad).

PCR

Se realizó una mezcla de reacción correspondiente para cada muestra trabajada.

Tabla 2. Mezcla de reacción para PCR de bacterias.

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Volumen (µL)
DNA molde	-----	100 µg/mL	1
H ₂ O destilada estéril	-----	-----	29.5
Buffer 10X	5X	1X	10

⁵ Características de los reactivos ver Anexo I

MgCl₂	25 mM	2.5 mM	5
dNTP MIX (Promega, USA)	10 mM	0.2mM	1
Cebador 9F	20 μM	1μM	1.5
Cebador 939R	20 μM	1μM	1.5
Taq Polimerasa (Promega, USA)	5u/μL	2.5u/μL	0.5
Volumen final			50

Tabla 3. Mezcla de reacción para PCR de Levaduras

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Volumen (μL)
DNA molde	-----	100 μL/mL	1
H₂O destilada estéril	-----	-----	27.5
Buffer 10X	5X	1X	10
MgCl₂	25 mM	2.5 mM	5
dNTP MIX (Promega, USA)	10 mM	200mM	1
Cebador ITS 5	20 μM	1μM	2.5
Cebador ITS 4B	20 μM	1μM	2.5
Taq Polimerasa (Promega, USA)	5u/μL	2.5u/μL	0.5
Volumen final			50

La mezcla de reacción se preparó en un tubo de microcentrífuga de 250 μL que se encontraba en baño de hielo, posteriormente la amplificación se llevó a cabo en un termociclador Corbett Research con los siguientes programas:

Tabla 4. Condiciones de reacción

	Bacterias	Levaduras
Pre calentamiento	94°C por 2 minutos	94°C por 2 minutos
Desnaturalización	94°C por 1 minuto	94°C por 45 segundos
Hibridación	65°C por 1 minuto	55°C por 45 segundos
Amplificación	72°C por 1 minuto	72°C por 1 minuto
Extensión	72°C por 5 minutos	72°C por 3 minutos
Ciclos	30	30

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% estimando el tamaño de los fragmentos por comparación de su movilidad con la del marcador estándar de 1kb.

Para bacterias se amplificó por PCR una región del gen 16S rDNA con los primers universales: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (E9F-forward) y 5'-CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC-3' (E939R-reverse), como fue reportado previamente por Forney y col (2004).

En el caso de las levaduras se usaron los primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4b (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') diseñados para, respectivamente, secuencias conservadas del gen 18S rDNA y 28S rDNA (Gardes and Bruns, 1993; Larena et al., 1999). Los productos amplificados incluyen, así, una secuencia parcial del gen 18S rDNA, el espaciador interno transcrito 1 (ITS1), el gen 5.8S rDNA completo, el espaciador interno transcrito 2 (ITS2) y una secuencia parcial del gen 28 s rDNA.

Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR se purificaron por medio de los sistemas comerciales Wizard™ SV Gel and Clean-Up System (Promega, USA). Conforme el manual técnico el protocolo siguiente:

1. Se agregó un volumen igual de solución de unión a la membrana a los productos de PCR.
2. Después esta mezcla se depositó en una minicolumna SV que se encontraba dentro de un tubo de colecta.
3. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto.
4. Se centrifugó a 16000 rpm por 1 minuto.
5. Se descartó el líquido del tubo de colecta y se insertó nuevamente la minicolumna dentro del tubo de colecta.
6. Posteriormente la columna se lavó con 700 µL de solución de lavado de membrana, previamente diluida con etanol al 95%. Después se centrifugó a 16000 rpm por 1 minuto. Se desechó el líquido del tubo de colecta.
7. Se repitió el paso anterior con 500 µL de solución de lavado de membrana y se centrifugó durante 5 minutos a 16000 rpm.
8. Se vació el tubo de colecta y se dejó evaporar el etanol residual a temperatura ambiente durante 5 minutos.
9. Se transfirió la minicolumna a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL.
10. Después se agregaron 50 µL de agua libre de nucleasas a la minicolumna y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto.
11. Se centrifugó la 16000 rpm por 1 minuto.
12. Finalmente se descartó la minicolumna y se guardó el DNA a 4°C.

Secuenciación del DNA

La secuenciación de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la UAM-I.

Una vez que las secuencias fueron obtenidas se realizó la comparación de las regiones amplificadas con las ya registradas en las bases de datos en este caso la comparación se hizo mediante la utilización de GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) que esta disponible en la siguiente dirección electrónica: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

RESULTADOS Y DISCUSION

Al poder contar con el análisis proximal de las piezas de queso de Poro con que se trabajaron, gracias a un proyecto realizado en paralelo, se puede tener un panorama más amplio sobre las condiciones fisicoquímicas con las que cuenta el queso, esto es el microambiente encontrado en las muestras (Tabla N°5).

Tabla N°5. Análisis proximal de las muestras de queso⁶

Parámetro	Quesos							Promedio
	El Tigre	3 hermanos	Usumacinta	4 Hermanos	La Natividad	Bejucal	San Marquito	
Aw	0.94	0.94	0.95	0.95	0.97	0.93	0.96	0.95
pH	3.8	3.9	4.2	3.9	3.7	3.7	3.9	3.87
% ácido láctico	1.2	0.8	0.7	0.7	0.9	0.9	0.7	0.84
% NaCl	2.5	2.2	2.3	1.9	0.7	2.3	1.9	1.97
% humedad	33.7	29.6	32.5	32	32.2	29.7	36.3	32.29
ST	66.4	70.4	67.4	37.4	67.8	70.3	63.7	63.34
% (BS) cenizas	4.7	3.9	5	3.9	2.2	4.9	4.2	4.11
% (BS) grasa	63.8	48.3	52.4	57.9	52.8	62.6	55.2	56.14
%(BS) proteína	41.4	48.6	47.5	45.7	44.7	36.4	45.9	44.31

El pH encontrado en las piezas de queso oscila entre 3.8-4.2, como se sabe el pH al que se encuentran los quesos es variable dependiendo del tipo de queso del que se trate tanto si es madurado o no, en este caso el pH que es inferior a 5 nos indica que en el queso de Poro existe un gran porcentaje de ácido láctico. En este tipo de productos existe una fermentación inicial por bacterias acidolácticas que produce una gran cantidad de ácido lo cual se traduce en la

⁶ Estos datos son resultado de un proyecto paralelo sobre el análisis fisicoquímico de las mismas piezas de queso de poro de trabajo (Contreras G, 2011).

disminución del pH. Por otro lado, el pH bajo puede influir en la cantidad y tipo de microorganismos que se desarrollen en el queso. Es decir esta condición favorece el crecimiento de cierto tipo de microorganismos e inhibirá el de otros.

En este caso al no recibir ningún tratamiento térmico la leche que se utiliza para la elaboración del queso de poro, es leche bronca y es muy probable que contenga una alta carga microbiana, misma que permanecerá en el producto y a su vez ésta será la encargada de darle al queso sus características fisicoquímicas así como sensoriales. A su vez este medio ácido del microambiente del queso favorece el crecimiento y proliferación de varios microorganismos que formaran la flora nativa del queso, así como toda la indumentaria que tenga contacto con la pasta del queso en el proceso de su elaboración ya que es un proceso 100% artesanal



Imagen 4. Muestras de Queso Trabajadas



Imagen 5. Extractos de las muestras de queso

Tabla 6 Conteo en placa de los microorganismos presentes en el queso de Poro (expresados en log)

Muestra	Mesófilos aerobios(UFC/g)	Bacterias lácticas (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)	Hongos y levaduras (UFC/g)
Queso Bejucal	5.477121255	5.00	3.602059991	5.477121255
Queso 3 hermanos	5.00	5.30	5.00	5.477121255
Queso 4 hermanos	5.00	5.00	4.301029996	5.3
Queso Natividad	5.30	5.30	4.477121255	5.00
Queso Tigre	4.30	5.00	4.477121255	5.477121255
Queso San Marquito	5.00	4.477121255	4.30	5.00
Queso Usumacinta	5.00	5.30	5.00	4.30
Límites establecidos Por la NOM-243-SSA1-2010	No reportado	No reportado	100 UFC/g	500 UFC/g

La tabla N° 6 muestra los resultados expresados del conteo en placa y al comparar directamente estos datos podemos observar que quedan muy por arriba de los límites máximos en ambos valores reportados por la norma es decir para coliformes totales y hongos y levaduras. En cuanto a las UFC/g de hongos y levaduras el límite es de 500 UFC/g para quesos frescos y madurados, en todas las muestras de trabajo el número que se encontró es mayor que éste, posteriormente la identificación de este tipo de microorganismos aislados de las muestras de trabajo nos permitiría concluir que se trata de levaduras en un gran porcentaje y no de hongos. En base a esto ninguno de los productos analizados cumpliría con esta norma, aunque dicha comparación no es del todo válida ya que la NOM-243-SSA1-2010 se refiere a productos elaborados a base de leche pasteurizada y como ya sabemos el queso de Poro esta elaborado con leche bronca sin ningún tratamiento térmico.

Al llevar acabo la siembra de los extractos de queso en medios diferenciales como era de esperarse se encontró una alta población en todos los medios y al observar la morfología colonial de los microorganismos podemos destacar que algunas colonias provenientes del Agar EMB presentaron un brillo metálico lo que indica la presencia en el queso de microorganismos coliformes, así como otras presentaron coloración rosa lo que indica que son microorganismos que pueden metabolizar la lactosa, estos a su vez es muy probable que provengan de la leche que se usa como materia prima para la elaboración del queso así como el gran número de bacterias lácticas que fueron aisladas a partir del agar MRS. Por otra parte en el agar AN (para microorganismos mesófilos aerobios) se presentó el crecimiento de una colonia cuya morfología colonial y microscópica (cocos Gram +, colonia color crema, convexa y viscosa) es muy característica de los microorganismos de *Staphylococcus sp.* generalmente estos microorganismos están presentes en los productos comerciales gracias a la contaminación de estos por contacto humano (Stainer,1996).

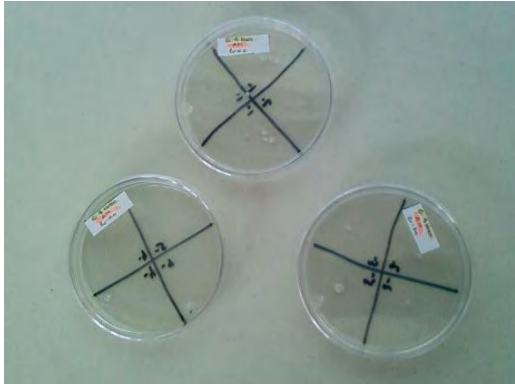


Imagen 6. Siembra en medios diferenciales, agar AN.

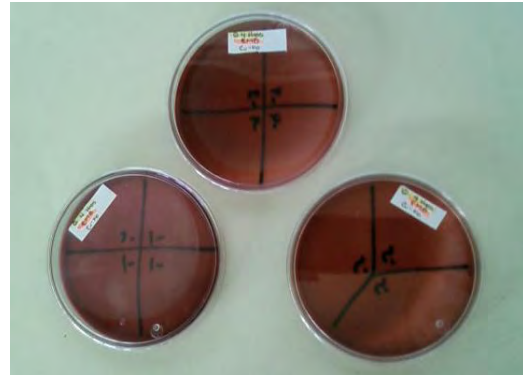


Imagen 7. Siembra en medios diferenciales, agar EMB.



Imagen 8. Microorganismos aislados en tubos.



Imagen 9. Microorganismos aislados en tubos.

Tabla 7 Morfología de los microorganismos aislados⁷

MEDIODE AISLAMIENTO	No. DE CEP A	Morfología Colonial					Morfología microscópica
		Color	Forma	Borde	Elevación	Textura	
AN	1	blanca	circular	entero	convexa	seca	bacilos cortos, Gram +
AN	2	beige	circular	entero	convexa	viscosa	levaduras ovoides
AN	3	café claro	amiboide	entero	convexa	viscosa	cocos, Gram +
EMB	1	púrpura	circular	entero	convexa	viscosa	bacilos cortos, con extremos redondeados, Gram +
EMB	2	rosa claro con centro púrpura	circular	entero	convexa	seca	bacilos con extremos redondeados, Gram -
PDA	1	blanca	circular	entero	convexa	seca	levaduras forma ovoide
PDA	2	crema	circular	entero	convexa	viscosa	levaduras forma ovoide
PDA	3	blanca	circular	entero	convexa	seca	levaduras forma ovoide
MRS	1	blanca	circular	entero	convexa	viscosa	cocobacilos (bacilos cortos), Gram +

Queso 3 hermanos							
MEDIODE AISLAMIENTO	No. DE CEP A	Morfología Colonial					Morfología microscópica
		Color	Forma	Borde	Elevación	Textura	
AN	1	crema	circular	entero	convexa	viscosa	estreptococos, Gram +
AN	2	blanca	circular	entero	convexa	viscosa	levaduras de forma ovoide
PDA	1	blanca	circular	entero	convexa	viscosa	levaduras de forma ovoide
MRS	1	blanco con beige	circular	entero	convexa	viscosa	bacilos largos de extremos redondeados, Gram +
MRS	3	naranja obscuro	circular	entero	convexa	seca	bacilos Gram +

⁷ La descripción de las colonias se hizo en base al Manual de Prácticas de Microbiología General (Ramírez G., 2006)

Queso 4 hermanos							
MEDIODE AISLAMIENTO	No. DE CEP A	Morfología Colonial					Morfología microscópica
		Color	Forma	Borde	Elevación	Textura	
EMB	2	azul con brillo metálico	amiboide	ondulado	plana	seca	bacilos largos, con extremos redondeados, Gram -
MRS	1	blanca	circular	entero	convexa	viscosa	bacilos largos, con extremos redondeados, Gram +
MRS	2	beige	circular	entero	convexa	viscosa	levaduras forma ovoide

Queso Natividad							
MEDIODE AISLAMIENTO	No. DE CEP A	Morfología Colonial					Morfología microscópica
		Color	Forma	Borde	Elevación	Textura	
AN	1	blanco	circular	entero	convexa	viscosa	bacilos, Gram -
AN	3	beige	circular	entero	convexa	viscosa	bacilos cortos, extremos redondeados Gram +
EMB	1	azul con brillo metálico	amiboide	ondulado	plana	seca	bacilos largos, Gram -
EMB	2	verde con brillo metálico	amiboide	ondulado	plana	seca	bacilos cortos, Gram +
EMB	3	púrpura con brillo metálico	amiboide	ondulado	plana	seca	bacilos cortos, Gram +
EMB	5	rosa con centro morado	circular	entero	convexa	seca	cocos Gram-
EMB	6	verde con brillo metálico	amiboide	entero	convexa	seca	bacilos largos, Gram -
PDA	1	beige	amiboide	entero	convexa	viscosa	levaduras forma ovoide
PDA	2	blanca	circular	entero	plana	seca	levaduras forma ovoide
PDA	3	blanca	circular	entero	plana	viscosa	levaduras forma ovoide

PDA	5	blanca con centro beige	circular	entero	plana	seca	levaduras forma ovoide
PDA	6	beige	circular	entero	elevada	seca	levaduras forma ovoide
PDA	7	beige con centro blanco	circular	entero	elevada	seca	levaduras forma ovoide
MRS	1	blanca con centro beige	circular	entero	convexa	seca	bacilos extremos redondeados, Gram +
MRS	2	beige	circular	entero	convexa	seca	bacilos, extremos redondeados, Gram +

Queso San Marquito							
MEDIODE AISLAMIENTO	No. DE CEP A	Morfología Colonial					Morfología microscópica
		Color	Forma	Borde	Elevación	Textura	
AN	1	blanca	circular	entero	convexa	viscosa	bacilos cortos, Gram +
AN	2	amarilla	circular	entero	convexa	viscosa	bacilos cortos, Gram +
AN	3	crema	amiboide	ondulado	plana	seca	bacilos cortos, extremos redondeados, Gram -
AN	4	crema	amiboide	ondulado	plana	seca	bacilos cortos, extremos redondeados, Gram +
AN	5	crema	amiboide	ondulado	plana	seca	bacilos cortos, Gram +
EMB	1	púrpura	circular	entero	convexa	viscosa	estreptobacilos Gram +
PDA	1	crema	amiboide	entero	elevada	viscosa	levaduras forma ovoide
PDA	2	blanca	amiboide	entero	elevada	viscosa	levaduras forma ovoide
MRS	1	blanca	circular	entero	convexa	viscosa	bacilos cortos, Gram +
MRS	2	beige	circular	entero	convexa	viscosa	bacilos cortos, Gram +

Queso Tigre							
MEDIODE AISLAMIENTO	No. DE CEP A	Morfología Colonial					Morfología microscópica
		Color	Forma	Borde	Elevación	Textura	
AN	2	blanca	amiboide	ondulado	plana	seca	estreptobacilos, Gram +
AN	3	crema	amiboide	ondulado	plana	seca	bacilos, extremos redondeados, Gram +
PDA	1	blanca	circular	entero	convexa	viscosa	levaduras forma ovoide

PDA	2	blanca	amiboide	entero	plana	viscosa	levaduras forma ovoide
MRS	1	blanca	circular	entero	convexa	viscosa	bacilos cortos con extremos redondeados, Gram +
MRS	2	beige con centro blanco	circular	entero	convexa	viscosa	bacilos largos, con extremos redondeados, Gram +

Queso Usumacinta							
MEDIODE AISLAMIENTO	No. DE CEPAS	Morfología Colonial					Morfología microscópica
		Color	Forma	Borde	Elevación	Textura	
AN	1	blanco	circular	entero	elevada	viscosa	cocos Gram+
EMB	1	púrpura con brillo metálico	circular	entero	plana	seca	bacilos cortos, Gram +
EMB	2	púrpura	puntiforme	entero	plana	viscosa	bacilos cortos, Gram +
PDA	1	blanca	circular	entero	convexa	viscosa	levaduras, forma ovoide
MRS	1	blanca	circular	entero	convexa	seca	bacilos largos con extremos redondeados, Gram +
MRS	2	beige con centro naranja	circular	entero	convexa	seca	bacilos cortos, Gram +

De las siete piezas de Queso de Poro trabajadas se aislaron un total de 54 cepas y una vez que los microorganismos fueron aislados se determinaron pruebas de actividad metabólica es decir pruebas de actividad proteolítica y lipolítica, así como formación de gas, debido a la importancia y aportación que éstas brindan durante los cambios bioquímicos en la maduración del queso.

En cuanto a los microorganismos aislados se puede observar que un gran porcentaje corresponde a (61.10 %) bacterias esto habla de que esta es la población predominante debido al

microambiente formado en el queso. A su vez de esta población de bacterias aisladas la mayoría corresponde a bacterias lácticas. Esto puede deberse a que la población de microorganismos en el queso de poro proviene enteramente de la leche bronca utilizada para su elaboración.

Imagen 10. Tipo de microorganismos aislados de las piezas de queso de estudio

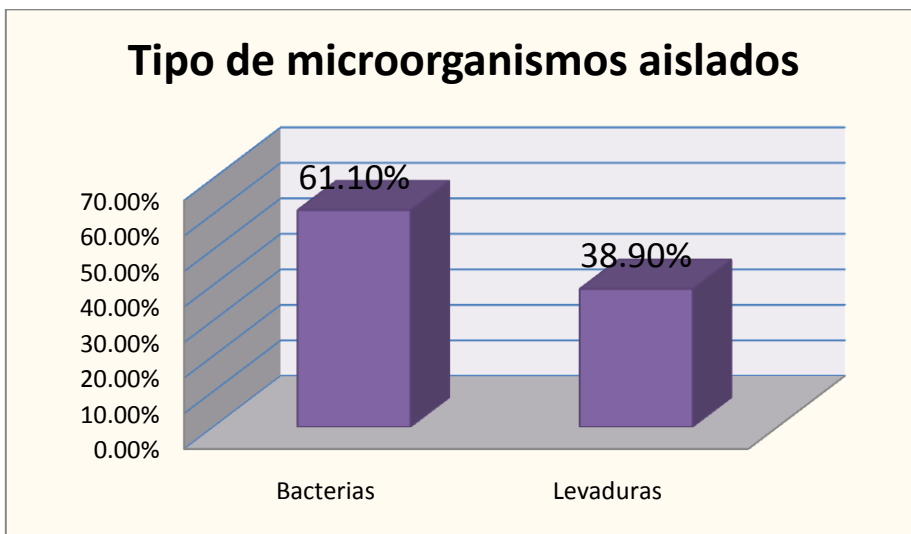
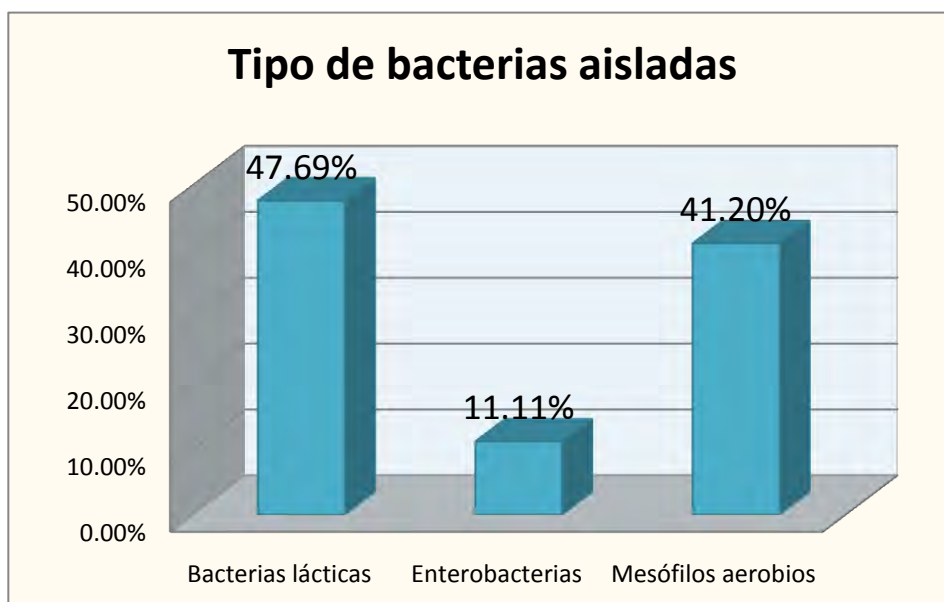
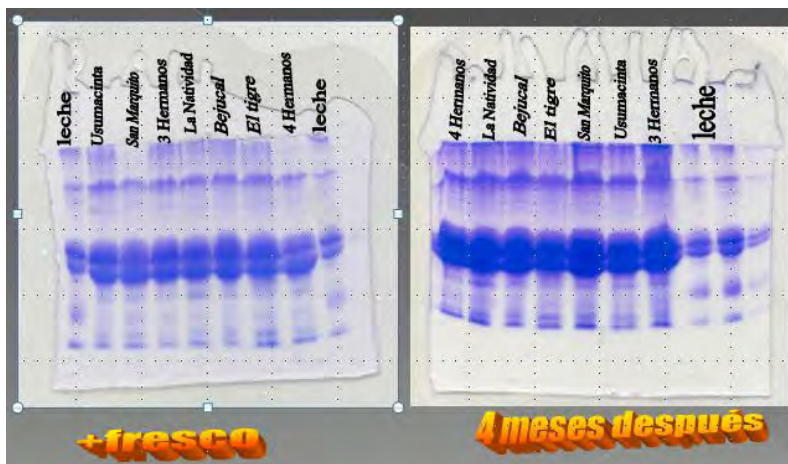
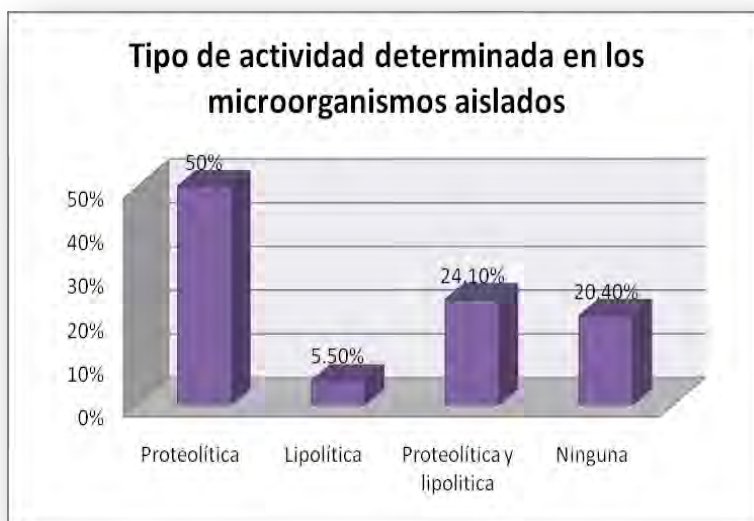


Imagen 11. Tipo de bacterias aisladas de las piezas de queso de estudio



A su vez es claro en la imagen N° 11 que se pudo aislar un porcentaje de enterobacterias, aunque este es muy pequeño (11.11%) no podemos descartar la posible presencia de uno o más microorganismos patógenos que pudieran generar algún daño en la salud de la población que consume el Queso de Poro, pero también sabemos que existen microorganismos que son clasificados como enterobacterias y que no presentan ningún riesgo, es decir pueden estar presentes bajo ciertas cantidades permisibles.

Imagen 12. Tipo de actividad metabólica determinada en los microorganismos aislados



Al recabar la información obtenida en la imagen N° 12 donde es claro que la mayoría (50%) de los microorganismos aislados presenta actividad proteolítica.

Imagen 13 Proteólisis en las piezas de Queso de Poro de trabajo

En el caso del Queso de Poro la presencia de proteólisis, imagen N° 13 podemos observar gracias a un estudio fisicoquímico que se realizó en paralelo, de las mismas piezas de trabajo, donde podemos observar claramente que el grado de lipólisis aumenta del estado del queso fresco y comparar con realizar el mismo estudio 4 meses después, esto nos indica la presencia de microorganismos proteolíticos en las 7 piezas de queso. Así como los aportes de la proteólisis en el sabor y textura del Queso de Poro.

El proceso proteolítico en la maduración de los quesos es importante porque:

- Contribuye directamente o indirectamente en el olor del queso
- Potencia el sabor, ya que se liberan sustancias sápidas durante la masticación.
- Contribuye a la ruptura de la red proteica de la cuajada (solubiliza la proteína) y esto puede afectar la textura
- En ocasiones, es causa del desarrollo de características no deseadas (coloraciones marrones, formación de cristales y sabores amargos)(Chamorro, 2002).

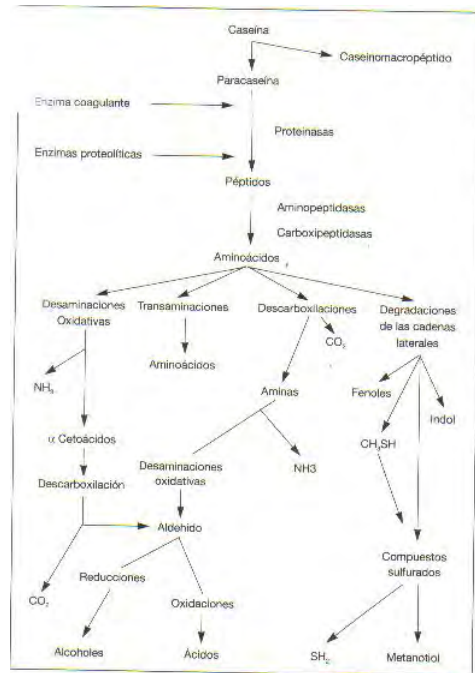


Imagen 14. Degradación de la caseína, proteína mayoritaria de la leche (Chamorro, 2002)

Durante la maduración, las proteínas se descomponen en compuestos nitrogenados más simples. En primer lugar, se degrada a péptidos que, por la acción de algunas aminopeptidasas y carboxipeptidasas se escinden en sus aminoácidos constituyentes. Estos contribuyen al conjunto olfato-gustativo básico del queso, sobre todo aquellos que poseen un sabor amargo (Chamorro, 2002).

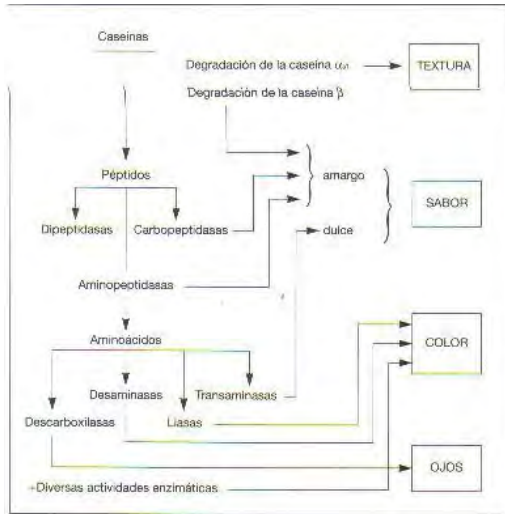


Imagen 15. Influencia de la descomposición de la caseína en las características finales del producto (Chamorro, 2002)

Como se puede observar en la imagen N°15 la actividad proteolítica también influye en la textura final del producto debido a la degradación de la red proteica puede facilitar la formación de los ojos en el queso, característica muy particular en el queso de poro.

También podemos observar en la imagen N°12 el siguiente porcentaje corresponde a los microorganismos que cuentan con actividad lipolítica y proteolítica, y en tercer lugar a los que solo cuentan con actividad lipolítica.

La lipólisis de los componentes grasos del queso en el proceso de maduración es de importancia para el desarrollo del sabor, sin embargo como se observa en la imagen N°16, que

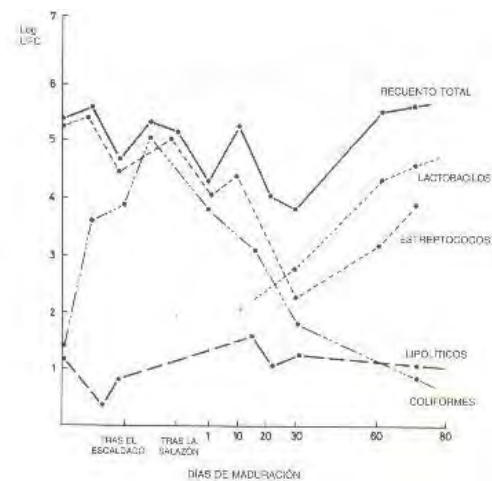


Imagen 16 Cambios en la población de la flora microbiana en el proceso de maduración del queso (Scott, 1998).

corresponde a los cambios de población microbiana en el proceso de maduración de un queso típico y basada en la población microbiana típica de la leche ,la población de microorganismos lipolíticos es baja desde el principio del proceso de maduración del queso, y es por esta razón que la mayor parte de la grasa permanece intacta durante dicho proceso, esto favorece ciertos beneficios en el sabor final del queso debido a que la grasa:

- Es un disolvente de los componentes del olor, que modifican sus umbrales de percepción.
- Interviene en los equilibrios que existen entre las formas disociadas y no disociadas de los ácidos grasos.

En el queso hay ácidos grasos libres, unos estaban ya en la leche recién ordeñada y otros son consecuencia de la lipólisis, que ha podido sufrir la materia grasa mientras estaba en la leche o posteriormente en el queso.

Lo que se observa en la imagen N°16 son datos arrojados en los casos de quesos elaborados con leche que ha sufrido algún tratamiento térmico previo a la elaboración del queso, en el caso del Queso de Poro, podemos observar gracias a un estudio fisicoquímico que se realizó en paralelo sobre las mismas piezas de trabajo, que el grado de lipólisis es significativo en las piezas de queso, esto puede deberse a varios factores, como el hecho principal de que la leche utilizada no tiene ningún proceso de pasteurización por lo que los microorganismos lipolíticos provengan en su mayoría de ésta, pero también es

importante mencionar que durante el proceso de la elaboración del Queso de Poro no hay ningún momento en el que el queso sea sometido a refrigeración por lo tanto estos microorganismos podrían seguir llevando a cabo la lipólisis en mayor porcentaje en comparación con los quesos de elaboración más típica.

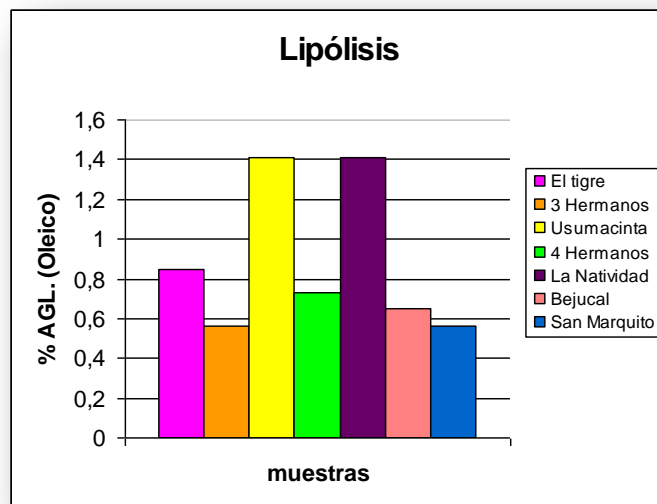


Imagen 17 Lipólisis presente en las piezas de Queso de Poro de trabajo

Ahora bien el principal papel de la lipólisis, aún en los quesos en que ésta es pequeña, es el de formar compuestos (ácidos grasos y sus productos derivados) que contribuyan a formar el conjunto olfato-gustativo.

A medida que progresa la lipólisis de la materia grasa, aumenta la concentración de ácidos grasos libres, lo que produce un gusto rancio o jabonoso (Chamorro, 2002).

En cuanto a la formación de gas un 38.9 % de la población correspondiente a las levaduras aisladas presentaron formación de gas positiva. Mientras que el 61.1% correspondiente a las bacterias, no presentó actividad de formación de gas alguna a partir de la fermentación de lactosa. Lo que indica que en su mayoría las levaduras aisladas pueden contribuir a la formación de los ojos en la pasta de queso que posteriormente constituirá los poros en el Queso de Poro. Estos poros son indispensables para las características sensoriales de este tipo de queso.

IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

Una vez que se había estudiado la morfología colonial y microscópica de los microorganismos aislados se procedió a su identificación de mediante la comparación de secuencia del gen ribosomal 16s.

En la actualidad existen muchos métodos analíticos muy sencillos y que requieren de muy poco material para extraer el ADN de los diferentes tipos de microorganismos. Esto es de suma utilidad para el proceso de PCR. (Barlett J., 2003). En las imágenes 18 y 19 podemos observar los geles que son resultado de las electroforesis realizadas para la comprobación de la presencia tanto del ADN extraído a los microorganismos aislados como productos de PCR.

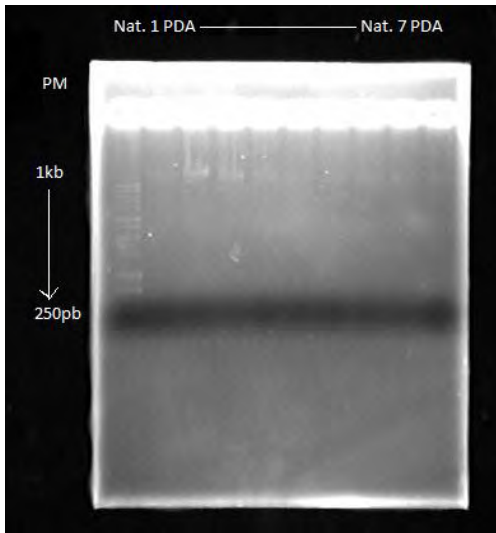


Imagen 18. Electroforesis de la extracción del ADN de las levaduras aisladas del queso Natividad

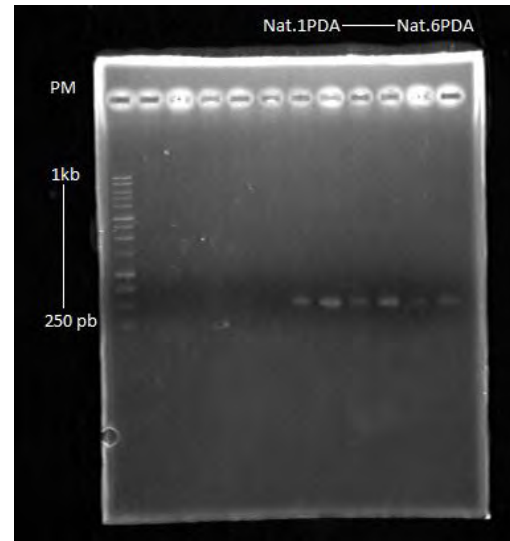


Imagen 19. Electroforesis de productos de PCR correspondientes a las levaduras aisladas del queso Natividad

Una vez obtenidos los productos de PCR, estos se secuenciaron. La secuenciación de productos de PCR es una herramienta para la identificación de microorganismos en base a su ADN (Hughes S., 2007). En la imagen N° 20 se puede observar la interpretación de una de la secuenciación obtenida para la cepa Natividad 5 PDA.

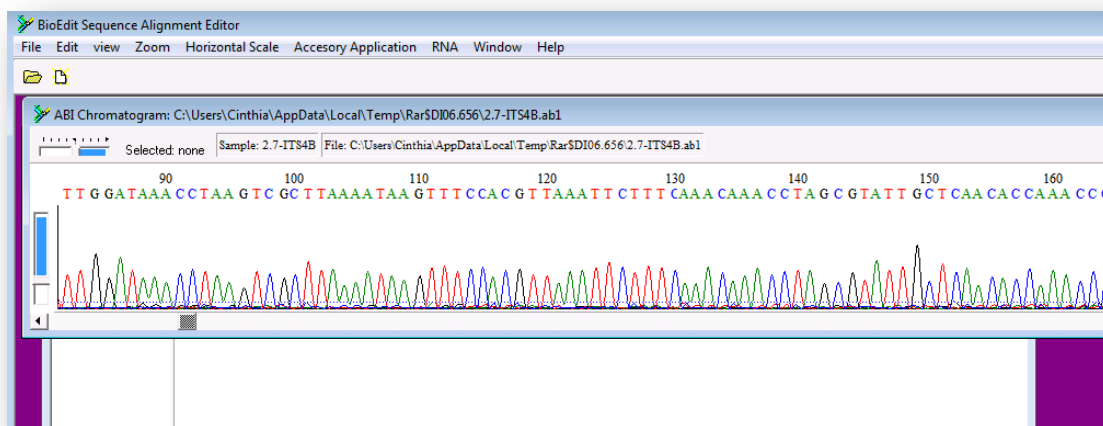


Imagen 20. Secuenciación del producto de PCR de la cepa Natividad 5 PDA

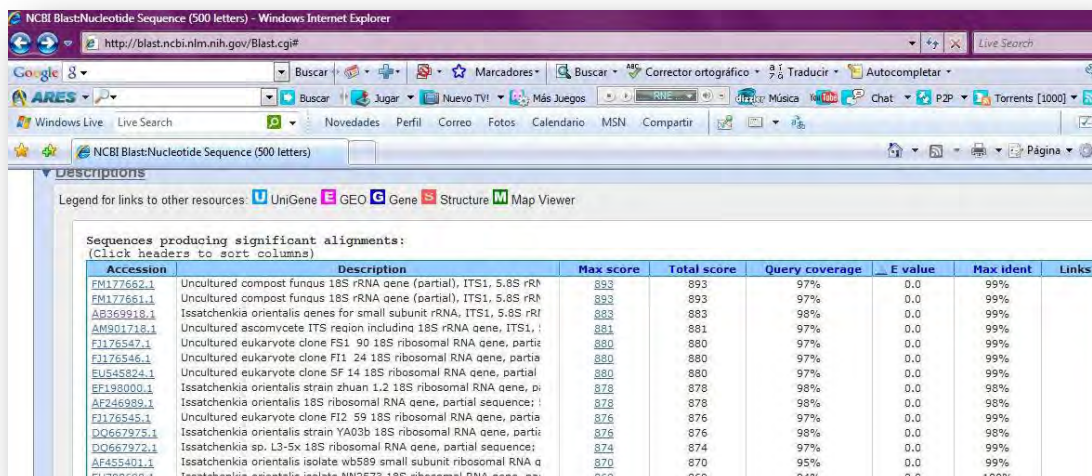


Imagen 21. Identificación del microorganismo Natividad 5 PDA al comparar la secuencia de su producto de PCR en la base de datos del NCBI

La identificación de los microorganismos por el método de PCR, nos permite obtener más información acerca de las características y comportamiento de cada microorganismo que pueda ser identificado por este método. (Innis, M., 1999). En la imagen N° 21 podemos observar la identificación de la cepa Natividad 5 PDA como *Issatchenkia orientalis* con un 98% de concordancia, en la secuencia que se introdujo en el sistema del NCBI.

Después de la identificación de las 54 cepas se pudo recabar la siguiente información.

Tabla 8 Resultados de la identificación de las cepas por PCR

M. AISLADO	IDENTIFICACION PROPUESTO	MAX SCORE	VALOR E	MAX IDENTIFICACION
Bejucal 1 AN	<i>Bacillus subtilis</i>	1323	0.0	99%
Bejucal 2 AN	<i>Candida tropicalis</i>	898	0.0	99%
Bejucal 3 AN	<i>Staphylococcus sp.</i>	650	0.0	98%
Bejucal 1EMB	<i>Bacillus sp.</i>	710	0.0	99%
Bejucal 2 EMB	No se pudo determinar			
Bejucal 1 PDA	<i>Issatchenkia orientalis</i>	520	0.0	96%
Bejucal 2 PDA	<i>Issatchenkia orientalis</i>	537	0.0	97%

Bejucal 3 PDA	<i>Issatchenkia orientalis</i>	876	0.0	99%
Bejucal 1 MRS	<i>Bacillus sp.</i>	1496	0.0	98%

M. AISLADO	IDENTIFICACION PROPUESTO	MAX SCORE	VALOR E	MAX IDENTIFICACION
3 hermanos 1 AN	<i>Staphylococcus sp.</i>	1411	0.0	98%
3 hermanos 2 AN	<i>Issatchenkia orientalis</i>	664	0.0	98%
3 hermanos 1 PDA	<i>Issatchenkia orientalis</i>	632	3e-178	100%
3 hermanos 1 MRS	<i>Lactobacillus casei</i>	1415	0.0	98%
3 hermanos 3 MRS	<i>Bacillus sp.</i>	1421	0.0	99%

M. AISLADO	IDENTIFICACION PROPUESTO	MAX SCORE	VALOR E	MAX IDENTIFICACION
4 hermanos 2 EMB	<i>Klebsiella sp.</i>	718	0.0	99%
4 hermanos 1 MRS	<i>Bacillus sp.</i>	1384	0.0	99%
4 hermanos 2 MRS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1214	0.0	99%

M. AISLADO	IDENTIFICACION PROPUESTO	MAX SCORE	VALOR E	MAX IDENTIFICACION
Natividad 1 AN	<i>Pseudomonas sp.</i>	1020	0.0	99%
Natividad 3 AN	<i>Bacillus subtilis</i>	592	0.0	97%
Natividad 1 EMB	<i>Klebsiella oxytoca</i>	843	0.0	95%
Natividad 2 EMB	<i>Bacillus sp.</i>	1400	0.0	96%
Natividad 3 EMB	<i>Bacillus sp.</i>	1038	0.0	99%
Natividad 5 EMB	No se pudo determinar			
Natividad 6	<i>Klebsiella oxytoca</i>	821	0.0	100%

EMB				
Natividad 1 PDA	<i>Issatchenkia orientalis</i>	872	0.0	98%
Natividad 2 PDA	<i>Issatchenkia orientalis</i>	870	0.0	100%
Natividad 3 PDA	<i>Kluyveromyces cremoris</i>	632	0.0	98%
Natividad 5 PDA	<i>Issatchenkia orientalis</i>	774	0.0	98%
Natividad 6 PDA	<i>Issatchenkia sp.</i>	821	0.0	98%
Natividad 7 PDA	<i>Pichia cecembensis</i>	431	2e-117	92%
Natividad 1 MRS	<i>Lactobacillus paracasei</i>	821	0.0	100%
Natividad 2 MRS	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1275	0.0	100%

M. AISLADO	IDENTIFICACION PROPUESTO	MAX SCORE	VALOR E	MAX IDENTIFICACION
Sn Maquito 1 AN	<i>Bacillus subtilis</i>	1264	0.0	99%
Sn Maquito 2 AN	<i>Bacillus licheniformis</i>	1293	0.0	99%
Sn Maquito 3 AN	No se pudo determinar			
Sn Maquito 4 AN	<i>Bacillus sp.</i>	1334	0.0	99%
Sn Maquito 5 AN	<i>Bacillus subtilis</i>	1081	0.0	98%
Sn Marquito 1 EMB	<i>Bacillus sp.</i>	1352	0.0	99%
Sn Marquito 1 PDA	<i>Issatchenkia orientalis</i>	880	0.0	100%
Sn Marquito 2PDA	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1243	0.0	99%
Sn Marquito 1 MRS	<i>Bacillus sp.</i>	1430	0.0	99%
Sn Marquito 2 MRS	<i>Lactobacillus paracasei</i>	821	0.0	100%

M. AISLADO	IDENTIFICACION	MAX SCORE	VALOR E	MAX
------------	----------------	-----------	---------	-----

	PROPUESTO			IDENTIFICACION
Tigre 2 AN	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1367	0.0	99%
Tigre 3 AN	<i>Bacillus sp</i>	1092	0.0	98%
Tigre 1 PDA	<i>Issatchenkia orientalis</i>	887	0.0	99%
Tigre 2 PDA	<i>Issatchenkia orientalis</i>	710	0.0	98%
Tigre 1 MRS	<i>Lactobacillus plantarum</i>	717	0.0	96%
Tigre 2 MRS	<i>Bacillus mojavensis</i>	1055	0.0	96%

M. AISLADO	IDENTIFICACION PROPUESTO	MAX SCORE	VALOR E	MAX IDENTIFICACION
Usumacinta 1 AN	<i>Staphylococcus sp.</i>	787	0.0	98%
Usumacinta 1 EMB	<i>Bacillus sp.</i>	939	0.0	99%
Usumacinta 2 EMB	<i>Bacillus sp.</i>	939	0.0	99%
Usumacinta 1 PDA	<i>Issatchenkia terricola</i>	401	1e-108	86%
Usumacinta 1 MRS	<i>Bacillus sp</i>	1055	0.0	99%
Usumacinta 2 MRS	<i>Lactobacillus casei</i>	828	0.0	98%

Una vez que ya se obtuvo la identificación de los microorganismos por medio de métodos de biología molecular es que podemos atribuir a que el mayor porcentaje de microorganismos presentes en el Queso de Poro se debe a la presencia de bacterias lácticas tales como *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus plantarum*. Estos géneros corresponden a bacterias típicas de la leche y los productos lácteos así como a *Lactobacillus casei* que además de ser un microorganismo comúnmente encontrado en los productos lácteos, se ha encontrado que en algunos casos es responsable de provocar defectos como en el queso Mozzarella debido a la producción de gas (M.P. Doyle, 1997). Sin embargo en este estudio la cepa aislada no presentó actividad de

formación de gas esto puede deberse a que ciertos microorganismos sólo presentan algunas actividades metabólicas bajo determinadas condiciones en el medio en que se desarrollan. Esto también nos ayuda a entender el gran porcentaje de ácido láctico en las piezas de Queso de Poro.

Basándonos en lo ya discutido anteriormente encontramos que después de las bacterias lácticas el resto de la población corresponde a enterobacterias y mesófilos aerobios, dentro de la población de enterobacterias aisladas e identificadas encontramos a *Klebsiella sp* así como *Klebsiella oxytoca* lo cual nos indica presencia de coliformes en el producto esto puede deberse a que la elaboración del queso de poro es un proceso 100% artesanal en el que la leche no sufre ningún proceso térmico para poder garantizar la inocuidad del producto final, generalmente este microorganismo se encuentra como contaminante del agua y del aire, así como también ha sido encontrado en el estudio de productos lácteos (Saeb,2003), por lo que al entrar en contacto con la leche permanecerá durante todo el proceso hasta estar presente en el producto final. Al encontrar a dicho microorganismo en el queso de poro nos habla de la falta de seguridad alimentaria debido a que *Klebsiella sp.* así como *Klebsiella oxytoca* en seres humanos puede provocar enfermedades como endocarditis, meningitis, enteritis o infecciones de partes blandas, es decir su presencia en alimentos significa un riesgo a la salud del consumidor (Bernard, 1984).

Dentro de los microorganismos identificados en la clasificación de mesófilos aerobios encontramos a *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mojavensis* estos microorganismos generalmente se encuentran como contaminantes de suelos (Roman-Blanco,C., 1999) y en lo seres humanos presentan un comportamiento oportunista al provocar enfermedades de partes blandas y en algunos casos enfermedades gastrointestinales como es el caso de *Bacillus thuringiensis* que se ha demostrado es productor de enterotoxinas

capaces de provocar diarreas en humanos. (Gouping ,2007). Por otra parte tenemos también a *Staphylococcus* sp que se identifica generalmente como microorganismo contaminante producto de la manipulación humana ya que es huésped de la piel en los seres humanos. Sin embargo *Staphylococcus* sp en bajas poblaciones no presentan ningún riesgo de enfermedad al consumidor por ingestión del producto debido a que necesita estar presente en grandes poblaciones para producir toxinas.

Por otra parte se encontró que un 38.9% de la población total aislada corresponde a levaduras, dentro de este grupo se pudo identificar microorganismos como *Pichia* sp, *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia terrícola*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces marxianus* así como *Kluyveromyces cremoris*. De estos la mayoría como lo son *Pichia* sp., *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia terrícola*, *Kluyveromyces marxianus* y *Kluyveromyces cremoris* han sido aislados en estudios de productos lácteos como quesos frescos, quesos madurados y la leche misma. Esto es debido a que las levaduras pueden ser encontradas en los quesos debido a su adaptabilidad en productos con altos niveles de sal, bajos valores de pH y bajos niveles de actividad acuosa(K. Lopandic, et. al.,2007).Debido a que las especies pertenecientes al género *Kluyveromyces* producen B-galactosidasa y son potentes fermentadoras de azúcares, *K.marxianus* es una de las dos levaduras que más abundan en los productos lácteos, además de encontrarse en gran variedad de frutas y causar alteraciones en los quesos como lo es el hinchamiento de la pasta de queso generado por la formación de gas (Jay, 1992). Por otra parte tenemos que *Candida tropicalis* se encuentra generalmente en la piel y mucosas humanas y es causante de enfermedades en el ser humano como la septicemia y la candidiasis lo cual significa un riesgo para la salud del consumidor del producto (Jawets, 1999).

Imagen 22. Frecuencia de la presencia de microorganismos identificados en los quesos estudiados

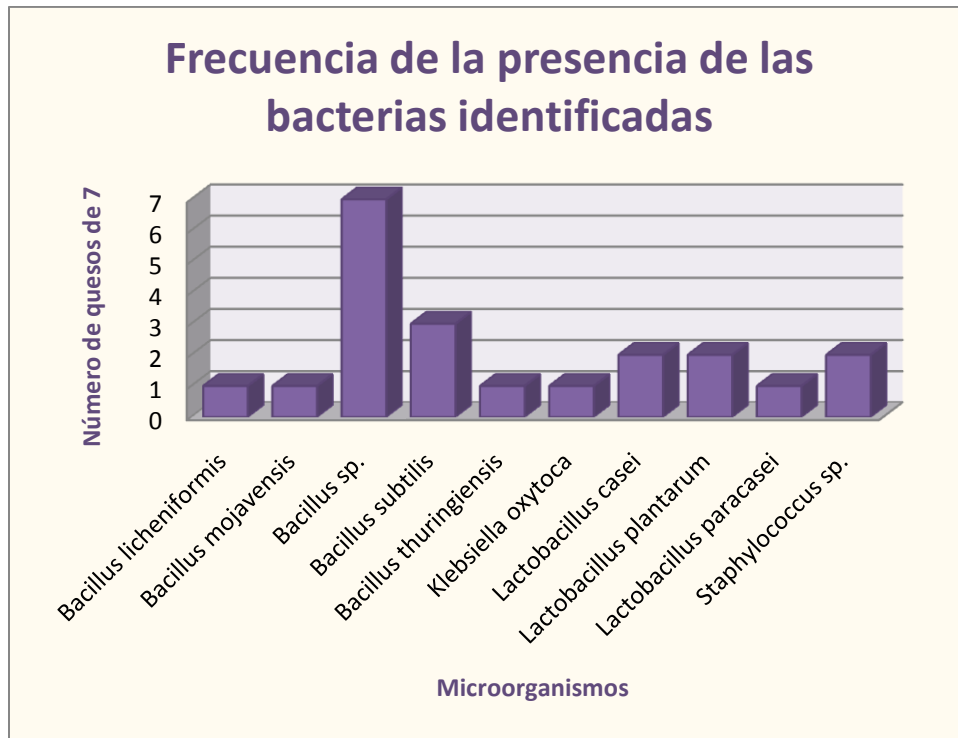
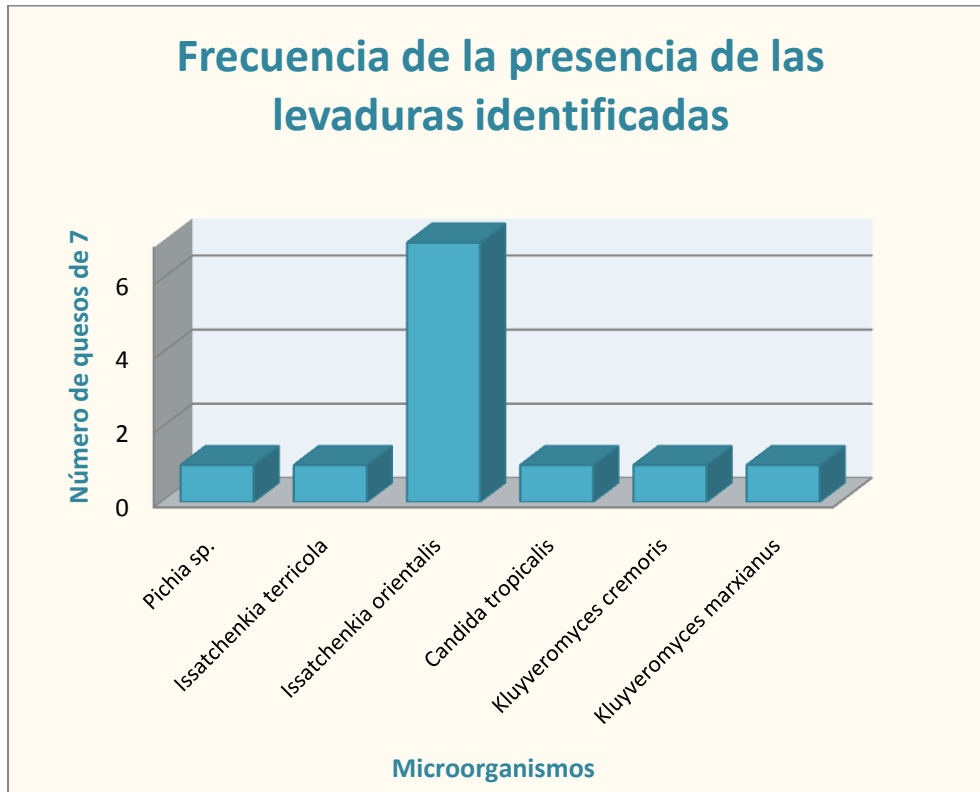


Imagen 23. Frecuencia de la presencia de los microorganismos identificados en los quesos estudiados



En cuanto a la frecuencia de las levaduras que se identificaron en las piezas de queso de estudio se puede mencionar que el microorganismo identificado como *Issatchenkia orientalis* se encuentra presente en las 7 piezas de queso estudiadas esto puede ser debido a que como ya se mencionó anteriormente este microorganismo es propio de los productos lácteos, sin embargo al realizar las pruebas de actividad metabólica y saber que este microorganismo tiene la capacidad de generar gas, podemos asociar a este microorganismo como responsable de tener un papel importante en la formación de la textura del queso de poro ya fue encontrado en todas la piezas de queso de estudio y en cantidades considerables.

Al contar con la identificación de los microorganismos aislados y los resultados de las pruebas de actividad metabólica a las que fueron sometidos es evidente la posible aportación que tienen estos en la formación de las características físicoquímicas y sensoriales del queso de Poro (tabla N° 6), como se observa todos los microorganismos presentaron actividad proteolítica, mientras que sólo 2 de las especies aisladas presentaron actividad lipolítica y como ya fue mencionado antes solo las levaduras presentaron formación de gas positiva por lo que es posible que estas últimas estén muy relacionadas con la formación de la textura y del sabor del Queso de Poro. Esto es mas claro en las imágenes N° 13 y 17 que ilustran la proteólisis y la lipólisis presente en las piezas de que queso de poro, como ya fue discutido anteriormente.

Tabla 5 Actividad metabólica de los microorganismos aislados

Microorganismo	Act. Proteolítica	Act. Lipolítica	Formación de gas
<i>Bacillus licheniformis</i>	+	-	-
<i>Bacillus mojavensis</i>	+	+	-
<i>Bacillus sp</i>	+	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	-

<i>Lactobacillus casei</i>	+	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	+	-	-
<i>Staphylococcus sp</i>	+	+	-
<i>Pichia sp</i>	+	-	+
<i>Issatchenkia terricola</i>	+	-	+
<i>Issatchenkia orientali</i>	+	-	+
<i>Candida tropicalis</i>	+	-	+
<i>Kluyveromyces cremoris</i>	+	+	+
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	+	+

Se podría considerar a *I.orientalis* para la propuesta un inóculo en el caso de realizar un producto tipo queso de poro que garantizara la inocuidad ante el consumidor, debido a que la formación positiva de gas que tuvo este microorganismos con respecto a los demás hace mas notoria su aportación en las características del queso sin embargo no se puede ignorar las otras aportaciones de los demás microorganismos es decir como a las bacterias lácticas que pueden ser responsables de la alta acidez del queso y que se lograron identificar como bacterias típicas de la leche así como por ejemplo de las levaduras *Kluyveromyces* y *Kluyveromyces marxianus* que han sido aisladas de productos lácteos comerciales, sólo se debe considerar que el crecimiento de cualquiera de los microorganismos que se planea incluir en el inóculo entre dentro de los límites establecidos por la NOM-243-SSA1-2010, para que sea un producto seguro para su consumo.

CONCLUSIONES

- El Queso de Poro no cumple con la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-243-SSA1-2010, PRODUCTOS Y SERVICIOS. LECHE, FORMULA LACTEA, PRODUCTO LACTEO COMBINADO Y DERIVADOS LACTEOS.DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS. Debido a la presencia de un alto contenido de carga microbiana.
- A las 54 cepas aisladas y purificadas se les hicieron pruebas de actividad metabólica, como actividad proteólita, actividad lipólita y formación de gas. Del total de los microorganismos aislados sólo las levaduras presentaron actividad de formación de gas positiva.
- De las 54 cepas aisladas se identificaron 52, dentro de las cuales se encontraron 10 especies diferentes de bacterias y 6 especies diferentes de levaduras. Siendo las bacterias la población predominante.
- De los microorganismos identificados la mayoría han sido aislados de productos lácteos. *I. orientalis* y *Bacillus sp.* son los microorganismos que se encontraron con mayor frecuencia, es decir en las 7 piezas de queso por lo que es muy probable que estén involucrados en proporcionarle al queso de poro sus características tanto físico-químicas como sensoriales así como pueden ser parte de la flora nativa de la región.

RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio microbiológico del queso de Poro más apegado a lo señalado por la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-243-SSA1-2010, PRODUCTOS Y SERVICIOS. LECHE, FORMULA LACTEA, PRODUCTO LACTEO COMBINADO Y DERIVADOS LACTEOS.DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS
- Realizar estudios de inocuidad de las cepas aisladas e identificadas en este estudio para probar su viabilidad en la preparación de un inóculo que sea utilizado en la fabricación de un producto tipo queso de Poro.
- Realizar pruebas del crecimiento microbiano y de las actividades metabólicas de los microorganismos aislados.
- Realizar un perfil sensorial del queso de Poro

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, M.R.Y MOSS, M.O. MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS. ED. ACRIBIA. ESPAÑA. PP .382-385. 1995
- ALAIS, CHARLES. CIENCIA DE LA LECHE. PRINCIPIOS DE TECNOLOGÍA LECHERA. ED. REVERTÉ. BARCELONA
- ALBERTS, BRUCE. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CÉLULA. EDICIONES OMEGA. 1994. BARCELONA ESPAÑA. PP.286.
- AND MILK PRODUCTS IN JORDAN. FOOD MICROBIOLOGY. 20. 2003. FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, JORDAN UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY . IRBID, JORDAN. PP 225-230.
- BARLETT, J.M. PCR PROTOCOLS. SEGUNDA EDICION. HUMANA PRESS INC. UK. 2003 PP 35-53
- BERNARD D., ET AL. TRATADO DE MICROBIOLOGIA.TERCERA EDICION. SALVAT EDITORES. BARCELONA .1984. PP 209 ,265.
- BOURGEOIS C.M., JF MESCLE, J ZUCCA. MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA. EDIT ACRIBIA ZARAGOZA ESPAÑA, 1988. PP 209-211
- CERVANTES F.E., VILLEGAS DE GANTEA.,CESÍN VARGAS A.,ESPINOZA ORTEGA A., LOS QUESOS MEXICANOS: UN SABER HACER QUE SE DEBE RESCATAR Y PRESERVAR. III CONGRESO INTERNACIONAL DE LA RED SOCIAL “ALIMENTOS Y TERRITORIOS”.2008.PP 75-77
- CHAMORRO. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LOS QUESOS. PRIMERA EDICIÓN. EDICIONES MUNDI-PRESA. MADRID.2002. PP 125-129, 232, 234.
- CONTRERAS, G.CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DEL QUESO DE PORO. TESIS DE LICENCIATURA. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. MÉXICO. ANEXO I

- CLAROS GONZALO, ÁVILA CONCEPCIÓN. ET AL. BIOQUÍMICA APLICADA. MANUAL PARA DISEÑO EXPERIMENTAL Y EL ANÁLISIS DE DATOS EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA. UNIVERSIDAD DE MÁLAGA. SEPTEN EDICIONES. ESPAÑA. 2001. PP 106-121
- DILANJAN. FUNDAMENTOS DE LA ELABORACIÓN DEL QUESO. 1RA EDICIÓN. ACRIBIA. ESPAÑA. 1947. PP100-107.
- DOYLE, MICHEAL P. FOOD MICROBIOLOGY. FUNDAMENTALS AND FRONTIERS. ASM PRESS. U.S.A. 1997. PP 152-160.
- EARLY RALPH. TECNOLOGÍA DE LOS PRODUCTOS LÁCTEOS, ED. ACRIBIA. SEGUNDA EDICIÓN. ESPAÑA. PP 85-102. 1998.
- FORNEY LJ, ZHOU X, BROWN CJ. CURR OPIN MICROBIOL. MOLECULAR MICROBIAL ECOLOGY: LAND OF THE ONE-EYED KING. 2004 JUN;7(3):210-20.
- FOX F.P., GUINEE P. T. Y COGAN M. T., MCSWEENCY L. P., FUNDAMENTALS OF CHEESE SCIENCE. ED. ASPEN PUBLICATION. UNITED STATES OF AMERICA. PP 536-540. 2000.
- GARDES, M., BRUNS, T.D., 1993. ITS PRIMERS WITH ENHANCED SPECIFICITY FOR BASIDIOMYCETES – APPLICATION TO THE IDENTIFICATION OF MYCORRHIZAE AND RUSTS. MOL. ECOL. 2, 113–118.
- GEORGE J. BANWART. MICROBIOLOGÍA BÁSICA DE LOS ALIMENTOS. EDICIONES BELLATERRA. BARCELONA ESPAÑA. 1982. PP 258.46-53.
- GRAPPIN , 1985
- GUOPING, Z. ET AL. THE OCCURRENCE OF BACILLUS CEREUS, B. THURINGIENSIS AND B. MYCOIDES IN CHINESE PASTEURIZED FULL FAT MILK. INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY.191.2008. PP 195-200.
- HIGOSHI H. ET HAMADA S. PROTEOLYTIC AND LIPOLITYC ACTIVIES OF PSYCHROTROPHIC BACTERIA ORIGINATED FROM NEW MILK. J FOOD HUG. SOC. JAPAN, 17, 1975, PP 41-47.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- HUGHES S., MOODY A. PCR. SCION PUBLISHING.UK.2007. PP 319
- ICMSF. MICROORGANISMOS DE LOS ALIMENTOS.6. TECNOLOGÍA MICROBIANA DE LOS PRODUCTOS ALIMENTARIOS. ED. ACRIBIA. ESPAÑA. PP 522-531. 1998.
- INNIS MICHAEL, GELTAND DAVID. PCR APPLICATIONS. ACADEMIC PRESS. EU. 1999. PP. 56-62.
- JAWETS, ETAL. MICROBIOLOGIA MEDICA DE JAWETS, MELNICK Y ADELBERG.EL MANUAL MODERNO. MEXICO, D.F. PP 733.
- JAY, JAMES.M. MICROBIOLOGIA MODERNA DE LOS ALIMENTOS.ACRIBIA.3RA EDICION. ZARAGOZA ESPAÑA. 1992. 38-40
- JOHN G. HOLT, NOEL R. KRIEG, ETAL, BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. NOVENA EDICION. EDITORIAL LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS. PP 559,532.
- LARENA, I., SALAZAR, O., GONZÁLEZ, V., JULIÁN, M.C., RUBIO, V., 1999. DESIGN OF A PRIMER FOR RIBOSOMAL DNA INTERNAL TRANSCRIBED SPACER WITH ENHANCED SPECIFICITY FOR ASCOMYCETES. J. BIOTECHNOL. 75, 187–194.
- LOPANDIC,K., ZELGER, S., BANSZKY, L.K., ELISKASES-LECHNER F., PRILLINGER H. IDENTIFICATION OF YEASTS ASSOCIATED WITH MILK PRODUCTS USING
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-243-SSA1-2010, PRODUCTOS Y SERVICIOS. LECHE, FORMULA LACTEA, PRODUCTO LACTEO COMBINADO Y DERIVADOS LACTEOS.DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

- RAMIREZ GAMA R. MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. MÉXICO. PP 62-77. 2006.
- RODRÍGUEZ P. IDENTIFICACIÓN DE LA FLORA BACTERIANA Y DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL QUESO DE PORO DE TABASCO. TESIS DE LICENCIATURA. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. MÉXICO. PP 38-39, 67. 2007.
- ROMAN-BLANCO, C., SANZ-GOMEZ, J.J., LOPEZ-DIAZ, T.M., OTERO,A. , GARCIA-LOPEZ, M.L. NUMBERS AND SPECIES OF BAILLUS DURING THE MANUFACTURE AND RIPENING OF CATELLANO CHEESE. MILCHWISSENSCHAFT, 54(7).1999. PP 385-388.
- SAEB, N. IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF KLEBSIELLAE ISOLATED FROM MILK
- SCOTT. FABRICACIÓN DEL QUESO. SEGUNDA EDICIÓN. EDITORIAL. ACRIBIA. ESPAÑA.1998 PP.75-78,101,105.
- SPREER, EDGAR. LACTOLOGIA INDUSTRIAL. ACRIBIA. 2DA EDICIÓN. ZARAGOZA ESPAÑA. 1991. PP 217-223.
- TAGU DENIS, MOUSSARD CHRISTIAN. FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR. 2DA EDICIÓN. ACRIBIA. ZARAGOZA, ESPAÑA. 2003. PP74-78.
- TRADITIONAL AND MOLECULAR TECHNIQUES . FOOD MICROBIOLOGY. 23. 2006. PP 341-350.
- WALSTRA, P. Y GENES R., QUÍMICA Y FÍSICA LACTOLÓGICA. EDITORIAL ACRIBIA. ESPAÑA. PP 37-38. 1993.
- WIRTANEN, GUN, SALO, SATU, MAUKONEN, JOHANNA, BREDHOLT, SYLVIA Y MATTILA-SANDHOLM, TIINA. SANITATION IN DAIRIES.ESPOO 1997, TECHNICAL RESEARCH CENTRE OF FINLAND, VTT PUBLICATIONS 302. PP 22- 47

ANEXO I

REACTIVOS UTILIZADOS

Medios de cultivo

EMB (Agar Eosina y Azul de Metileno) de la marca BD Dixon (México)

MRS de la marca BD DIFCO

AGAR NUTRITIVO de la marca DIBICU

AGAR LECHE

15% (v/v) de leche descremada

15% de agar

Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Una reacción positiva es indicada por la formación de un halo claro alrededor de la colonia

AGAR TRIBUTIRINA (g/L)

Peptona 5

Extracto de levadura 3

Tributirina 10 ml

Agar 15

Modo de preparación

Disolver la peptona y el extracto de levadura en el agua, después agregar la tributirina y emulsificar, después agregar el agar y disolver con 5 minutos a ebullición.

Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Por último agregar la glucosa previamente esterilizada.

Una reacción positiva es indicada por la formación de un halo claro alrededor de la colonia

Materiales y reactivos adicionales utilizados en la extracción de DNA de los microorganismos aislados

Aislamiento de DNA de bacterias

- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL
- Baño de agua a 37°C
- Baño de agua a 80°C
- Isopropanol (J.T. Baker, México) a temperatura ambiente
- Etanol (J.T. Baker, México) al 70% a temperatura ambiente
- Solución de EDTA(J.T. Baker, USA), 50 mM (pH 8.0)
- Lisozima 10 mg/mL (Sigma, Cat.# L7651)

Aislamiento de DNA de levaduras

- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL
- Medio PMY
- Baño de agua a 37°C
- Isopropanol (J.T. Baker, México) a temperatura ambiente
- Etanol (J.T. Baker, México) al 70% a temperatura ambiente
- Solución de EDTA(J.T. Baker, USA), 50 mM (pH 8.0)
- Liticasa 40 mg/mL (Sigma, Cat.# L2524)

Características de los reactivos utilizados en la reacción de PCR.

- Tubos de microcentrífuga de 250 µL
- GoTaq DNA Polymerase (Promega, Cat. # M3005).
- Solución de unión de membrana
 - 4.5 M Isotiocianato de guanidina
 - 80% de etanol

- 16.7 M acetato de potasio (pH 8.0)
- Solución de lavado de membrana
 - 4.5M Isotiocianato de guanidina
 - 0.5M acetato de potasio (pH 5.0)
- Etanol (J.T. Baker, México) al 70% a temperatura ambiente

ANEXO II. SECUENCIAS

COLONIA

Bejucal 1 AN

CGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGT
AAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTNNNACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATA
AAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
CAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
ATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTT
GACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCG
TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCA
ACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGNNACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAG
GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA

Bejucal 2 AN

GATTTGAGGTCAAGTTATGAAATAAATTGTGGTGGCCACTAGCAAAATAAGCGTTTTGGATAAACCTAAGT
CGCTTAAAATAAGTTTTCCACGTTAAATTTCTTTCAAACAAACCTAGCGTATTGCTCAACACCAAACCCGGGGG
TTTGAGGGAGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTTGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG
ATTCGATGATTCACGAATATCTGCAATTCATATTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAA
CCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGACTATTGTAATAATAAATCAAGTTTGACTGTAAATAAAAAGTTTG
GTTTAGTTATAACCTCTGGCGGTAGGATTGCTCCCGCCACCAAAGAAATTTGTTCAATAAAAAACACATGTG
GTGCAATTAAGCAAATCAGTAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTA

Bejucal 3 AN

GCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATA
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTNNNG
GATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTAATCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATT
GGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA
TTGGAACTGGGAACTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCNTGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGA
GATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGG

Bejucal 1EMB

ACTCCGGGAAACCGGGGCTNNNACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTC
GGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGA
TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTC
GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAA
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGG
TCATTGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGNNACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCG
TGGGGAGCGA

Bejucal 1 PDA

ATTTGAGGTCAAGTTATGAAATAAATTGTGGTGGCCACTAGCAAAATAAGCGTTTTGGATAAACCTAAGTC
GCTTAAAATAAGTTTTCCACGTTAAATTTCTTTCAAACAAACCTAGCGTATTGCTCAACACCAAACCCGGGGT
TTGAGGGAGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTTGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGA

TTCGATGATTCACGAATATCTGCAATTCATATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAAC
CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGACTATTGTAATAATAAATCAAGTTTGACTGTAAATAAAAAGTTTGG
TTTAGTTATAACCTCTGGCGGTAGGATTGCTCCCGCCACCAAAGAAATTTGTTCAATAAAAAACACATGTGG
TGCAATTAAGCAAATCAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTA

Bejucal 2 PDA

TTCACCTGATTTGAGGTCGAGCTTTTTGTTGTCTCGCAACACTCGCTCTCGGCCGCCAAGCGTCCCTGAAAA
AAAGTCTAGTTCGCTCGGCCAGCTTCGCTCCCTTTCAGGCGAGTCGCAGCTCCGACGCTCTTTACACGTCGT
CCGCTCCGCTCCCCAACTCTGCGCACGCGCAAGATGGAAACGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCGGAAT
GCCGAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAGAACTCGATGATTCACGATGGCTGCAATTCACACTAGGTATCGCAT
TTCGCTGCGCTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTTGTTTTTTCGTAGATT
TCTTTGTCGACTATATGCTATATTCCACATTTTAGGTGTTGTTGTTTTCGTTCCGCTCACGCAGTGTAGTAGT
AAATCACAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACACT

Bejucal 3 PDA

TTCTTACCTGATTTGAGGTCGAGCTTTTTGTTGTCTCGCAACACTCGCTCTCGGCCGCCAAGCGTCCCTGAA
AAAAAGTCTAGTTCGCTCGGCCAGCTTCGCTCCCTTTCAGGCGAGTCGCAGCTCCGACGCTCTTTACACGTC
GTCCGCTCCGCTCCCCAACTCTGCGCACGCGCAAGATGGAAACGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCGGA
ATGCCGAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAGAACTCGATGATTCACGATGGCTGCAATTCACACTAGGTATCGC
ATTTGCTGCGCTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTTGTTTTTTCGTAGA
TTTCTTTGTCGACTATATGCTATATTCCACATTTTAGGTGTTGTTGTTTTCGTTCCGCTCACGCAGTGTAGTA
GTAAATCACAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACACT

Bejucal 1 MRS

GTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAA
ACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTGCAATAGGGCGG
TACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCG
GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAAGAGGAGAGTGAATCCACGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGTGACG
CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACNGGATTAGATACCCTGGNNGTCCACGCCGTAAACNATGAGT
GCTAGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTANTGNTGCAGCTAACGCATTANNACTCCGCCTGGGGA

3 hermanos 1 AN

TTCGAGCGAACGGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
TACCTATAAGACTGGAATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATGCCGATAACATTTGGAACCGCATGGTTCT
AAAGTAAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGG
CTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
AGTGATGAAGGTNNNNGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACGTGTCACA
TCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGC
TCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGAATTCNTGTGTAG
CGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACGTGACGCTG
ATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACNGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAN
TGTTAGGGG

3 hermanos 2 AN

ATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCT

TCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGNGAACT
TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGNANCGAAAGNNTGGGGNGCGANCNGGATTA
GATACCCTGNTAGTCACGCCGTA

3 hermanos 1 PDA

ATTTGAGGTCGAGCTTTTTGTTGTCTCGCAACTCGCTCTCGGCCCAAGCGTCCCTGAAAAAAGTCTA
GTTTCGCTCGGCCAGCTTCGCTCCCTTTAGGGCAGTCGCAGCTCCGACGCTCTTACACGTCGTCGCTCCG
CTCCCCAACTCTGCGCACGCGCAAGATGGAAACGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGAGG
GGCGCAATGTGCGTTCAAGAACTCGATGATTCACGATGGCTGCAATTCACACTAGGTATCGCATTTCGCTGC
GCTCTTCATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTTGTTTT

3 hermanos 1 MRS

CGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGACCCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAG
TAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCA
AGAACCAGTGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAGTGGAGGTTGATCGGCCACATTGG
GACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGA
TGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGCTTCGGGTCGTAAGAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGG
CAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCT
GATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAC
AGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGNCGAAGNCGGCTGTC
TGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAA

3 hermanos 3 MRS

GAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC
TGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTGAACCGCATGGTTCAAACA
TAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC
ACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAG
TGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTGAATAGGGCGGTACC
TTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT
CAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAGTCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGNAATTCCACGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTG
AGGANCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGNAGTCCACGCCGTAACNATGAGTGCT
AGTGTTNNGGGTT

4 hermanos 2 EMB

GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTC
GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAA
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGG
TCATTGGAAACTGGNGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGNANCGAAAGNN
TGGGGNGCGANCNGGATTAGATACCCTGNTAGTCACGCCGTA

4 hermanos 1 MRS

TGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGG TTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT AACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCC GCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGG GCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG CCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTC CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAA CTGACGCTGANGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG

4 hermanos 2 MRS

GAAATTTGATAATGTTTAAAAAGTGGATTTTTTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCA AGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTT CTTTCTTGCTATTTCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAA CACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACA AACACAAAACATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAAT ATTAAAAACCTTTCAACAACGGATCTTTGGTTCTCGCATCGATGAAAAACGCAGCGAAATGCGATACGTAAT GTGAATTGCAAAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCAT GCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAACATACTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAA ATTGCTGGCCTTTTTTATTGGATGTTTTTCTTTTTCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGC AAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTATACTGAGCGTATTGCAGTTATCGATA AGAAGAGAGCGTCTAGGCGACATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAATCAGTAGGAGTACTCGCTGACTAAGCA TATTCATAAAGCGGAG

Natividad 1 AN

GATCAAACCTCAATGCGTTAGCTGCCCAATAAAATCTCAAGGATTC AACCGGCTAGTTGACATCGTTTTTCGG GGTGGACTACCAGGTATCTAATCTGTTTGTCTCCACGCTTTCCACCTCAGTGTCAGTATGAGCCCAGG TGGTCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACCCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTC TGCCCTACTCTAGCTCGCCAGTTTTGGATGCACTTCCAGGTTGAGCCCGGGATTTACATCCAAATTAAC GAACCACCTACCCGCGCTTACGCCCAATAATTTCCATTAAAGCTTGACCCCTCTGATTTCCGCGGCTGCTG GCACAGAGTTAACCGGTGCTTATTCTGTGCGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTGCTTACTGCCCTTCTC CCAACTTAAGTGCTTTAAATCCGAAAACCTTCTCCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTACCCATT GTCCAAAAATCCCCTGCTGCCTCCCAAGGAGTCTGGACCGCTCTCAATTCCTGTTGGGACTGATCATCT TCTCATAAGAATACGGATCGAGCCCTTGGTGAGCCATTACCTCTCCACTAAATTAATCAACCAGGGTCTCT ATAGAGCAAGGGCCCCGAAAAGTCCCTGCCTTTTTCTCTCAGGGAAGAAGGGGGGATAAAAAGTTTCATTTT C

Natividad 3 AN

ACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTT ACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGA CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG AATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAA GCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA AAGGGCTCGCAGGCGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAA CTGGNGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACTGACGCTGAGNANCGAAAGNNTGGGGNGCG ANCNGGATTAGATACCCTGNTAGTCACGCCGTA

Natividad 1 EMB

TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATG

GAGGGGATAACTNCTGAAACGGTANCTAATACCGCATAACNTCGCANGACCAAAGAGGGGGACCTTC
GGGCTCTTGCCATCANNATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGAC
GATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACNCTGGAAGTACGACACGGNCCAGACTCCTACNGGAG
GCAGCAGNGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCANNCATGCCGCGNGNATGAAGAAGGCC
TTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGNGGAGGAAGGGAANAAGGTTAATAACCTTGNTNATTGACGTTACC
CNCANAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGNCANCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTNATCGG
AATTACTGGGCGTAAAG

Natividad 2 EMB

TCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG
CCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAA
CATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTAC
CTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGNTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGG
CTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCACGTGT
AGCGNTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGNGNAGGNGANTCTCTGGTCTGTNACTGACG
CTGANGANCGAAAGCNTGGGAGCGANCNNGATTAGATAACCTGGTAGTCCACNNCNTANNCNATGANT
GCTAGTGNTAGGGGGTTTTCCGCCCTTANTGNTGCAGCTA

Natividad 3 EMB

CNTGCANNTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCA
TGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGA
GGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATA
GGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCANGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG

Natividad 6 EMB

AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGG
TTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC
GCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGG
GCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCANGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAA

Natividad 1 PDA

CTGATTTGAGGTCGAGCTTTTTGTTGTCTCGCAACACTCGCTCTCGGCCGCAAGCGTCCCTGAAAAAAGT
CTAGTTCGCTCGCCAGCTTCGCTCCCTTTTCAGGCGAGTCGAGCTCCGACGCTCTTACACGTCGTCGGCTC
CGCTCCCCAACTCTGCGCACGCGCAAGATGGAAACGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGA
GGGGCGCAATGTGCGTTCAAGAACTCGATGATTCACGATGGCTGCAATTCACACTAGGTATCGCATTTTCG
TGCGCTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTTGTTTTTCGTAGATTTCTCT
TGTCGACTATATGCTATATTCCACATTTTAGGTGTTGTTGTTTTCGTTCGCTCACGCAGTGTAGTAGTAAT
CACAGTAATGATCCTTCCGCGAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTCNNNNCTTTTACTTC

Natividad 2 PDA

TGATTTGAGGTCGAGCTTTTTGTTGTCTCGCAACACTCGCTCTCGGCCGCAAGCGTCCCTGAAAAAAGTC

TAGTTCGCTCGGCCAGCTTCGCTCCCTTTAGGGCAGTTCGCAGCTCCGACGCTCTTACACGTCGTCGGCTCC
GCTCCCCAACTCTGCGCACGCGCAAGATGGAACGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGAG
GGGCGCAATGTGCGTTCAAGAACTCGATGATTCACGATGGCTGCAATTCACACTAGGTATCGCATTTGCT
GCGCTTTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTTTGTTCGTAGATTTCTTTG
TCGACTATATGCTATATTCCACATTTTAGGTGTTGTTGTTTTCGTTCCGCTCACGCAGTGTAGTAGTAAATCA
CAGTAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTAC

Natividad 3 PDA

TTGAGGTCGAGCTTTTTGTTGTCTCGCAACACTCGCTCTCGGCCGCAAGCGTCCCTGAAAAAAGTCTAGT
TCGCTCGGCCAGCTTCGCTCCCTTTAGGGCAGTTCGCAGCTCCGACGCTCTTACACGTCGTCGGCTCCGCTC
CCCCAACTCTGCGCACGCGCAAGATGGAACGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGAGGGGC
GCAATGTGCGTTCAAGAACTCGATGATTCACGATGGCTGCAATTCACACTAGGTATCGCATTTGCTGCGCT
CTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTTTGTTCGTAGATTTCTTTGTCGAC
TATATGCTATATTCCACATTTTAGGTGTTGTTGTTTTCGTTCCGCTCACGCAGTGTAGTAGTAAATCACAGTA
ATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTAC

Natividad 5 PDA

GAAGTACTGTGATTTTCGTGCTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAACAACACCTAAAATGTGGAATATAG
CATATAGTCGACAAGAGAAATCTACGAAAAACAACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATC
GATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACG
CACATTGCGCCCCTCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCGTTTCCATCTTGCGCGTGCGCAGA
GTTGGGGGAGCGGAGCGGACGACGCTGTAAGAGCGTCGGAGCTGCGACTCGCCTGAAAGGGAGCGAAG
CTGGCCGAGCGAACTAGACTTTTTTTCAGGGACGCTTGGCGGCCGAGAGCGAGTGTGCGAGACAACAAA
AAGCTCGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTAAGCATATCAATAAAGCGGAGG

Natividad 6 PDA

ACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAACAACACCTAAAATGTGGAATATAGCATAT
AGTCGACAAGAGAAATCTACGAAAAACAACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATG
AAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACA
TTGCGCCCCTCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCGTTTCCATCTTGCGCGTGCGCAGAGTTG
GGGAGCGGAGCGGACGACGCTGTAAGAGCGTCGGAGCTGCGACTCGCCTGAAAGGGAGCGAAGCTGG
CCGAGCGAACTAGACTTTTTTTCNNGGACCCTTGGCGGCCAAAAGCGAGGGTTGCNAGACAACAAAAGC
TCGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTAA

Natividad 7 PDA

TTGAGGTCGAGCTTTTTGTTGTCTCGCAACACTCGCTCTCGGCCGCAAGCGTCCCTGAAAAAAGTCTAGT
TCGCTCGGCCAGCTTCGCTCCCTTTAGGGCAGTTCGCAGCTCCGACGCTCTTACACGTCGTCGGCTCCGCTC
CCCCAACTCTGCGCACGCGCAAGATGGAACGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGAGGGGC
GCAATGTGCGTTCAAGAACTCGATGATTCACGATGGCTGCAATTCACACTAGGTATCGCATTTGCTGCGCT
CTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTTTGTTCGTAGATTTCTTTGTCGAC
TATATGCTATATTCCACATTTTAGGTGTTGTTGTTTTCGTTCCGCTCACGCAGTGTAGTAGTAAATCACAGTA
ATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTAC

Natividad 1 MRS

ATAACTCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCT
TCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGTTTTT
CGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTA
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGG
GTCATTGGAACTGGNGAATTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGNANCGAAAGN

NTGGGGNGCGANCNGGATTAGATACCCTGNTAGTCACGCCGTA

Natividad 2 MRS

GAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGGCAACTGGTGAGTAA
CACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTG
GACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAG
ATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGA
CTGAGACACGGCCAAACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG
GAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGA
GAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGACAGAAGAGGACAGT
GAAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCCGAA

Sn Maquito 1 AN

TCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG
CCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAA
CATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTAC
CTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGC
TCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGNGAATTGAGTGACAGAAGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGTACGCT
GAGNANCGAAAGNNTGGGGNGCGANCNGGATTAGATACCCTGNTAGTCACGCCGTA

Sn Marquito 2 AN

GTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAA
TCATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTGCAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG
GCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGG
NACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC
GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAATTGAGTGACAGAAGANGAGAGTGGAATCCACGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCCGAANNANGANTCTCTGGTCTGTAACGTAC
GCTGAGGCGCGA

Sn Marquito 4 AN

GGCTACCACTTACNGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGA
TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCANACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTT
GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAA
CCAGAAAGCCACGGNTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCNNGAATT
ATTGGGCGTAAAGGGCTCGCANGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCNCGGCTCAACCGGGGAGGG
NCATTGNAAACTGGGGAACCTTGAG

Sn Marquito 5 AN

GTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAA
ACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACNGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG

GCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
ANACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGG
TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGNTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCNNGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCANGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCN
CGGCTCAACCGGGGAGGGNCATTGNAAACTGGGGAACCTTGAG

Sn Marquito 1 EMB

CGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC
CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAAAC
ATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTAC
CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGC
TCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGANGNGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCT

Sn Marquito 1 PDA

TGATTTGAGGTCGAGCTTTTTGTTGTCTCGCAACACTCGCTCTCGGCCCAAGCGTCCCTGAAAAAAGTC
TAGTTCGCTCGGCCAGCTTCGCTCCCTTTAGGGCAGTGCAGCTCCGACGCTCTTACACGTCGTCGCTCC
GCTCCCCAACTCTGCGCACGCGCAAGATGGAAACGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGAG
GGGCGCAATGTGCGTTCAAGAACTCGATGATTCACGATGGCTGCAATTCACACTAGGTATCGCATTTTCGCT
GCGCTCTTCATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTTGTTTTTCGTAGATTTCTTG
TCGACTATATGCTATATTCCACATTTTAGGTGTTGTTGTTTTCGTCCGCTCACGCAGTGTAGTACTAAATCA
CAGTAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGAAACCTTGTTACA

Sn Marquito 2PDA

CCTGATTTGAGGTCAACTTTGAGAGTTTTGGTTAAAGCCGTATGCCTCAAGGAGACAAACACCAGCGAGTC
TTTATAACACCTATGAGTCTCTATGACCCAAGCTTACCACGAATTGGCGAAACCTAAGACGTAGATGTGCA
AGAGTCGANNNNATAGACTTGACACGCAGCCCTGCTCACGCAGATGGCAACGGCTAGCCACTTTCAAGTT
AACCCGAGACGAGTATCACTCACTACCAAAACCAAGGTTTGGAGAGAAATGACGCTCAAACAGGCATGC
CCCCTGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTGATGATTCACGAAAATCTGCAATTCACAA
ACATATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAATATT
AAATTTTATAGTATAATAGTTTTTATAATAACAAATATTGTTTGTGTTTATGTCCACTGGAGAGACGAGCTC
TCCAGGGAAGTAGTTCATAGAGAAAAAATCCATTGTGTTTAGGATGAGAAATAGAAAATGATAGCAGA
GAATCAAGAAGTGGCCGCGCAATTAAGCGCAGGCTTGTTCAGACGATCCCCCAGTAATCTATTTCATTCAT
AATCTTTAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGNAACCTTGT

Sn Marquito 1 MRS

GAGCGNGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG
CCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAA
CATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTAC
CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGC
TCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGNGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCT
GAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGNNGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCT

AGTGTTAGGGGTTCCGCCCTT

Sn Marquito 2 MRS

GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTG
GCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCA
ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG
TTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTA
CCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG
GAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACGGG
GAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGA
AAGCGTGGGGAGCGACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCACGCCGTAACGATGAGTGCT

Tigre 2 AN

GTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACTGCATGGTTC
GAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC
GGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGATGAAGGCTTCGGGTCGTAATACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGG
CACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACG
GCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGNGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGAC
TGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT

Tigre 3 AN

ACTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACT
CATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAA
TTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCGCCAGTTTCCAATGACCCCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTAC
ATCAGACTTAAGGAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATT
ACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAA
CGGTACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGT
CAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCA
GTGTGGNCGATCACCTCTCAGGNCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCNACTAGCT
AATGNGNCGCGGNTNATCTGTAAGTGGNAGNCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGC

Tigre 1 PDA

GATTTGAGGTCGAGCTTTTTGTTGTCTCGCAACACTCGCTCTCGGCCGCAAGCGTCCCTGAAAAAAGTCT
AGTTCGCTCGGCCAGCTTCGCTCCCTTNCAGGCGAGTCGCAGCTCCGACGCTTTTACACGTGTCGCTCC
GCTCCCCAACTCTGCGCACGCGCAAGATGGAACGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGAG
GGGCGCAATGTGCGTTAAGAAGTTCGATGATTCACGATGNCTGCAATTCACACTAGGTATCGATTTGCT
GCGCTTTCATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTTTGTTCGTAAGTTTCTCTT
TCGACTATATGCTATATCCACATTTAGGTGTTGTTGTTTTCGTTCCGCTCACGCAGTGTAGTACTAAATCA
CAGTAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACNNCTTTTACTTCCA

Tigre 2 PDA

TGGAAGTACTGTCGTTTCATGCTACACTTCGCTTGAGCGGAGCAGAAGACAACAACCTAAAATGTGGAA
TATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATCTACGAAAAACAACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTC
GCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTT
GAACGCACATTGCGCCCCTCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGGAGCGTGTTCATCTTGGCGGTGC

GCAGAGTTGGGGGAGCGGAGCGGACGACGTGTAAAGAGCGTGGAGCTGCGACTCGCCTGAAAGGGAG
CGAAGCTGGCCGAGCGAACTAGACTTTTTTTTCAGGGACGCTTGGCGGCCGAGAGCGAGTGTTGCGAGACA
ACAAAAAGCTCGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAAGCGGAGGAACC
AAATCCCGTTTGTGATTACCTTGGTACAACCTATTATTTTCCACCGACTCCCCAACCATGCTCACGGGCAA
AGACAAAAACATAAC

Tigre 1 MRS

TCCCCAGGCGGANTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTCA
TCGTTTACGGNATGGACTACCAGGTATCTAATCCTGTTTGGCTCCCATACTTTGAGCCTCAGCGTCAGTTA
CAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGANTTC
CACTNCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTCCNATGNNCNTCTNCGTTGAGCCNNNGGCTTTACAT
CAGACTTAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTAC
CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAATAACCGTCAA

Tigre 2 MRS

ATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCT
TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCT
CTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GGGCTCGCAGGCGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACT
GGNGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGNANCGAAAGNNTGGGGNGCGAN
CNGGATTAGATACCCTGNTAGTCACGCCGTA

Usumacinta 1 AN

CCTGCCTAGTAGTACATGCCGTCGAGCGACAGATGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGT
GAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATATA
TATTTTGAACCGCATGGTTCAATAGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAG
CTAGTTGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATACCTACGCGACCTGAGAGGGTGATCGGCACACTGG
AACTGAGGACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACG
GAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAATTTGTT
AGTAACTGAACAAGTCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACTTGCCACGAGCCGCGGTAA
TAACGTAGGTGGCATGCGTTATCCGGAATTATTGTGCG

Usumacinta 1 EMB

CGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAAC
CGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTG
AATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGT
GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG
AATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTC
TGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCACGCCGTAAA
CGATGAGTGCT

Usumacinta 2 EMB

AGTAGTACATGCCGTCGAGCGACAGATGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
CACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATATATATTTG
AACCGCATGGTTCAATAGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTT
GTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATACCTACGCGACCTGAGAGGGTGATCGGCACACTGGAACCTGA

GGACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCA
ACGCCGCTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAATTTGTTAGTAA
CTGAACAAGTCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACTTGCCACGAGCCGCGGTAATAACG
TAGGTGGCATGCGTTAT

Usumacinta 1 PDA

GTTACGACTTTTACTTCCACCTCTTCTCCGCTTATTGATATGCCTTGTTACGACTTTTACTTCCACCTCTCTTT
CCGGTTAGTGGCATGTCCTGCGATCTTTACACGTGGTCCGCTCCGCTCCCCAACTCTGCGCACGTGCAAGA
TGAAACGACGCTCAAACCGGCATGCCCCCGGAATGCCGAGGGGCGCAATGTGCCTTCAAGAACTCGAT
GATTCACGATGGGTGCAATTCACACTAGGTATCGCATTTTCGCTGCACTTTCATCGATGCGAGAACCAAGAG
ATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTTGTTTTTAAAGAATCCCTGGTGAATAAATGCCTAATTTCCACTTTTAG
GAGTTGTGGTTTCCGTCCTCCGCGGGGAAACTAAAACCCGGAATGATTCTCCGGAGGGCCCTTG
GGAAACCTGGTTCCAATTTTTT

Usumacinta 1 MRS

CCCAGGGATGTGACGCGAGCGCACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAA
CCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTC
GAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCCTAAGTCTGATG
TGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAAGTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG
GAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGT
CTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGCTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAGCACTCCGCTGGGAGAG
CGTCGCAGACTGAAACTCAAAGAATTGA

Usumacinta 2 MRS

ACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACT
CATCGTTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTT
ACAGACCAGAGAGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCACGATTTACCGCTACACGTGGAATT
CCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCGCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGTTGAGCCGGGGGCTTTCACAT
CAGACTTAAGGAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTAC
CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTGCAACG
GTAATTGTTCTTCCCTAACACAGAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCA
GACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCAGT
GTGGNCGATCACCTCTCAGGNCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACC