



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

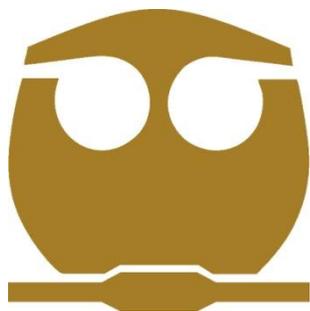
ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN
ESPACIAL DE LA MICROBIOTA
BACTERIANA EN QUESO COTIJA POR LA
TÉCNICA DE FISH

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
**GRISEL ALEJANDRA ESCOBAR
ZEPEDA**

Tutora: DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH



MÉXICO, D. F.

Julio 2012



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.

ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LA MICROBIOTA BACTERIANA EN QUESO COTIJA POR LA TÉCNICA DE FISH

RECONOCIMIENTOS

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

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

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM
Dr. Francisco Ruíz Terán	Facultad de Química, UNAM
Dr. José Adelfo Escalante Lozada	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. José de Jesús García Valdéz, del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la UNAM, en cuyo laboratorio se llevó a cabo el desarrollo de los electrodos utilizados en los experimentos de determinación de potencial redox.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Hilda Calderón Villagómez en los experimentos de caracterización de perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases.

El proyecto fue apoyado parcialmente por el PAPIIT IN230511. Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente	Dra. María del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM.
Vocal	Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja	Inst. Inv. Biomédicas, UNAM.
Vocal	Dr. Víctor Manuel Luna Pabello	Facultad de Química, UNAM.
Vocal	Dra. Esperanza Martínez Romero	Ctro. C. Genómicas, UNAM.
Secretario	Dr. Francisco Ruíz Terán	Facultad de Química, UNAM.

CONTENIDO

	Pág.
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
3.1. Caracterización fisicoquímica	4
3.2. Microbiota bacteriana del queso Cotija	20
3.3. Técnicas moleculares en el estudio de poblaciones microbianas	25
4. Justificación	37
5. Hipótesis	38
6. Objetivos	38
7. Estrategia Experimental	39
8. Metodologías	41
9. Resultados y discusión	54
9.1. Resultados análisis fisicoquímico	54
9.2. Análisis de hibridación <i>in situ</i>	70
10. Conclusiones	109
Anexo 1. Pruebas de reproducibilidad del sistema de electrodos	110
Anexo 2. Método de Lowry para medir proteína	111
Anexo 3. Cinéticas de crecimiento y relación UFC/mL para cepas puras	112
Anexo 4. Análisis estadístico de Duncan	113
Anexo 5. Estructura del gen ribosomal 16S y zonas de hibridación de las sondas	115
Anexo 6. Accesibilidad en zonas de hibridación del gen ribosomal 16S	116
Anexo 7. Controles de autofluorescencia	117
Anexo 8. Controles negativos de hibridaciones cruzadas	119
Referencias	122

1. Resumen

La pieza de queso Cotija región de origen analizada tenía forma cilíndrica de aprox. 26 cm de diámetro por 16.5 cm de alto y había sido madurada por 3 meses. Ésta fue dividida en 4 zonas de 3 cm de espesor comenzando por el centro y la corteza fue considerada la zona 5 con un espesor de 0.5 cm.

El objetivo de este trabajo fue describir la composición bacteriana de los principales géneros responsables de actividades metabólicas de interés en el queso Cotija en función de la existencia de gradientes de composición fisicoquímica. Ya que se trabajó con un queso de gran formato, se esperaba que existieran estratos definidos.

La caracterización fisicoquímica incluyó la determinación de actividad acuosa (a_w), cloruros, pH, acidez, calcio, potencial redox (Eh), perfil electroforético de proteínas (solubles y caseínas) y perfil de ácidos grasos totales y libres.

Con el fin de definir la ubicación espacial de los microorganismos fue necesaria la aplicación de la metodología de hibridación *in situ*, debido a la imposibilidad de cultivar la microbiota bacteriana completa en condiciones de laboratorio. Las sondas para FISH se diseñaron a nivel de género de acuerdo a reportes bibliográficos o mediante alineamientos y tuvieron como blanco regiones variables del gen ribosomal 16S de *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., y *Enterococcus* spp. todos ellos con actividad metabólica proteolítica y/o lipolítica importantes.

La especificidad fue evaluada *in silico* en las principales bases de datos y en cepas puras. Se optimizaron las condiciones de permeabilización enzimática así como las condiciones de hibridación en cepas puras y posteriormente se realizaron hibridaciones en el paquete celular extraído de las 5 diferentes zonas.

Se comprobó la existencia de gradientes en la composición del queso Cotija que indicaron una mayor concentración de cloruros, calcio y mayor pH en las zonas cercanas a la corteza y que disminuyeron hacia el centro. Contrario a la acidez y el a_w que fueron mayores en zonas centrales y que se vieron disminuidas hacia la corteza. El Eh fue negativo en toda la matriz del queso, lo que indicó una atmósfera pobre en oxígeno.

Los perfiles electroforéticos de proteínas se encontraron muy similares entre zonas, sólo en la corteza se observó un incremento significativo de la hidrólisis de caseínas. Se observó liberación de ácidos grasos en todas las zonas, con predilección por C13:0 y C18:2, pero no por butírico.

Los gradientes fisicoquímicos observados se deben principalmente a la pérdida de humedad gradual que ocurre a partir de la exposición de la superficie de la pieza a la atmósfera. A pesar de ser un queso de gran formato, los gradientes no tuvieron intervalos tan grandes como para hacer una selección de la microbiota dentro del producto, lo que se ve reflejado en que los perfiles de proteólisis y lipólisis, sean semejantes en su interior así como la distribución de cada uno de los géneros estudiados donde aparentemente ninguno de ellos es dominante. Éstos representaron sólo el 11% de la microbiota bacteriana presente en esta pieza de queso Cotija.

2. Introducción

El queso Cotija es un alimento nacional de producción otoñal, originario de la sierra que se encuentra entre Jalisco y Michoacán (sierra de Jalmich), de gran importancia en la región de origen y que ha ganado fama debido a que es reconocido internacionalmente por su sabor y calidad (queso Cotija región de origen, ganador del premio internacional como mejor queso extranjero en el certamen celebrado en Cremona, Italia, en el año 2006 (18)). Su particularidad es que al ser un producto elaborado a partir de leche cruda de vaca, su maduración ocurre mediante la interacción de la microbiota natural del producto que cambia libremente durante un tiempo mínimo de tres meses y que puede prolongarse hasta varios años. Los microorganismos que interactúan en un ambiente también cambiante, pueden provenir ya sea de la sal adicionada, de la atmósfera del local en el que se lleva a cabo la maduración, del material de quesería, del contacto con el quesero, etc.

El proceso de maduración en los quesos se explica por la actividad enzimática presente, cuya mayor parte es de origen microbiano. Por ello, todos los factores que influyen sobre el desarrollo de los microorganismos, la producción de enzimas y su actividad serán determinantes en este proceso. Entre éstos sobresalen la actividad acuosa, el pH, el potencial redox, la temperatura y el contenido de sal entre otros.

La maduración del queso inicia a partir de una pasta homogénea y culmina con la obtención de un producto que ha sufrido cierto grado de deshidratación superficial evidente por la formación de la costra característica y cambios en su composición microbiológica. Aunque pareciera ser homogéneo en cuanto a sus características de textura, color y olor, podría existir un gradiente de concentración de sus componentes que genere microambientes, por lo que resulta interesante dilucidar cómo es la distribución espacial de la microbiota en el producto final así como algunos aspectos clave de la composición en estratos de la pieza, que es de gran formato.

Estudiar una comunidad con tales características por métodos tradicionales que implican aislamiento y/o enriquecimiento en medios de cultivo, sería sumamente laborioso y la información que se obtendría sería limitada, por lo que en este trabajo acudimos al empleo de métodos independientes de cultivo para el esclarecimiento de la distribución espacial de la microbiota en el alimento.

El objetivo de este trabajo es el de esclarecer, como una aproximación general, la composición espacial fisicoquímica y la distribución bacteriana en una pieza de queso Cotija a través de la hibridación con sondas fluorescentes específicas (FISH) para tres géneros bacterianos de interés por sus actividades metabólicas proteolítica y lipolítica que han sido identificados con mayor frecuencia en otras piezas de queso Cotija. Tales son: *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp.

3. Marco Teórico

El queso Cotija ha sido estudiado ampliamente en el grupo de trabajo de la Facultad de Química de la UNAM. Una de las aportaciones desde el punto de vista microbiológico fue la comprobación de la disminución drástica de coliformes en el producto terminado, aunque hayan sido detectados en etapas tempranas del proceso (1), tal y como lo muestra la Figura 3.1.1.

Además, la maduración de la pasta durante un tiempo mínimo de 100 días, permite el desarrollo de bacterias lácticas, algunas de las cuales con capaces de degradar la pared celular de microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus* (2). Asimismo se dan cambios en los valores de a_w y pH que finalmente llevan a la selección de una microbiota que es capaz de resistir ante condiciones ácidas y de baja disponibilidad de agua.

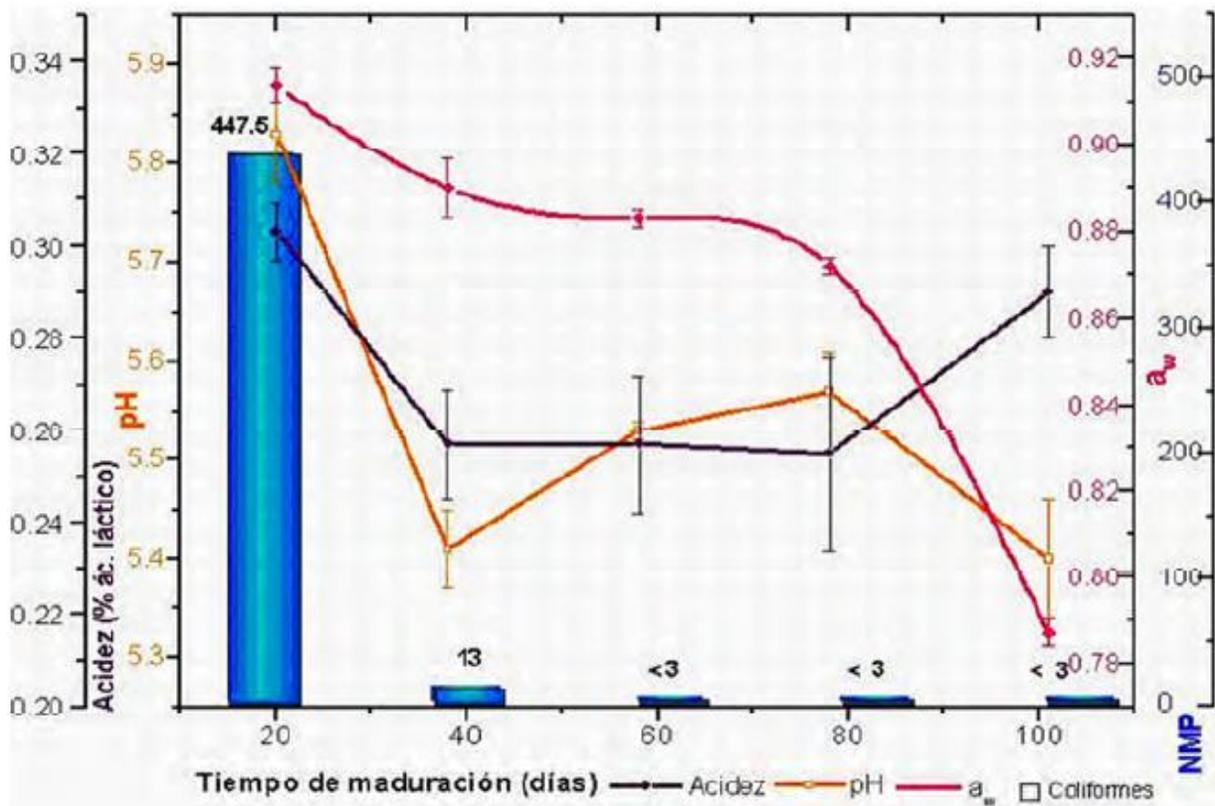


Fig. 3.1.1. Relación de la cuenta de coliformes, a_w , pH y %acidez, respecto al tiempo en una muestra de queso Cotija proveniente de la región de origen (1).

Pero las aportaciones van más allá del aspecto de inocuidad y caracterización microbiológica, pues se han realizado a la par estudios fisicoquímicos, (3), que podrían ayudar a la estandarización de los componentes del alimento puntualizándola en función al tiempo de maduración, con lo que se aporta información valiosa y necesaria para la descripción del producto.

Con estos antecedentes, se plantea realizar la caracterización fisicoquímica y de la microbiota bacteriana en función de la distribución espacial en una pieza completa, para lo cual se han implementado metodologías en el laboratorio tales como la determinación del potencial redox directamente sobre el queso y la aplicación del método de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes para la detección de bacterias.

3.1 Caracterización fisicoquímica

Es necesario combinar los métodos moleculares de análisis de poblaciones microbianas con la caracterización fisicoquímica para conocer el ambiente que determina su desarrollo, pues parámetros como la actividad acuosa, condiciones de aerobiosis o anaerobiosis y el pH, entre otros, impiden el crecimiento de ciertos microorganismos y favorecen el de otros.

De los parámetros antes mencionados, la actividad de agua y el contenido de sal son probablemente los más importantes tanto para el desarrollo de microorganismos, como para la velocidad a la que ocurren determinadas reacciones químicas o bioquímicas, además de que modulan incluso las propiedades de textura (4).

Actividad de agua (a_w) y contenido de sal

La actividad acuosa representa la disponibilidad de agua que requiere un sistema para las diferentes reacciones que precisan una fase acuosa. Se representa por la relación entre la presión de vapor del agua presente en un sistema (P) y la presión del agua pura (P_o) a la misma temperatura y presión atmosféricas (5):

$$P/P_o = a_w \quad 0 \leq a_w \leq 1$$

El a_w es un factor muy importante en el desarrollo de los microorganismos y en la actividad enzimática, ya que la mayoría de las bacterias requieren una actividad de agua aproximada de 0.92 para crecer (6). En quesos, la actividad acuosa viene determinada por dos parámetros esenciales: el contenido de agua y la cantidad de sal (7), aunque existen diferentes factores que pueden modificarlo:

- 1.- La pérdida de humedad por evaporación debida a que la superficie del queso se encuentra expuesta a la atmósfera.
- 2.- El aumento en el contenido de nitrógeno soluble durante la maduración, en virtud de que los péptidos y aminoácidos producidos por proteólisis ligan agua en cada enlace hidrolizado.
- 3.- Conforme aumenta la cantidad de solutos en el medio, disminuye su actividad de agua debido a que una parte importante de estas moléculas participa en la solvatación de los iones de la sal disuelta.

El contenido de sal interviene en la impartición de sabor en queso y limita el desarrollo de microorganismos indeseables regulando la humedad de la cuajada. Una disminución en el a_w

reduce la actividad enzimática, aumenta la duración de la fase de latencia de los microorganismos y acorta selectivamente la velocidad de crecimiento, por esta razón es que los quesos húmedos se maduran más rápidamente que los quesos muy desuerados.

Microorganismos halófilos o halotolerantes pueden desarrollarse en un medio con baja actividad acuosa (y/o alta concentración de sal), mientras otros, por el contrario, son inhibidos por descensos sutiles en el a_w (4).

El término "halófilo" viene del griego, donde "halo" es "sal" y "filo" es "amante de", es decir, "amante de la sal". Sin embargo no todos los microorganismos halófilos tienen los mismos requerimientos de sal, por lo que tienden a agruparse en función del intervalo de concentración de sal que necesitan para tener un crecimiento óptimo (Figura 3.1.2.). El criterio no está universalmente unificado pero en general se consideran dos tipos de halófilos propiamente dichos:

- Halófilos moderados, cuando presentan un crecimiento óptimo en medios que contienen entre 5 y 20% de NaCl. Ejemplos de ellos son algunas especies de *Pseudomonas*, y *Bacillus*.
- Halófilos extremos, si crecen óptimamente en medios que presentan una concentración de entre el 20-30% de NaCl. Tal es el caso de *Halobacterium salinarum*.

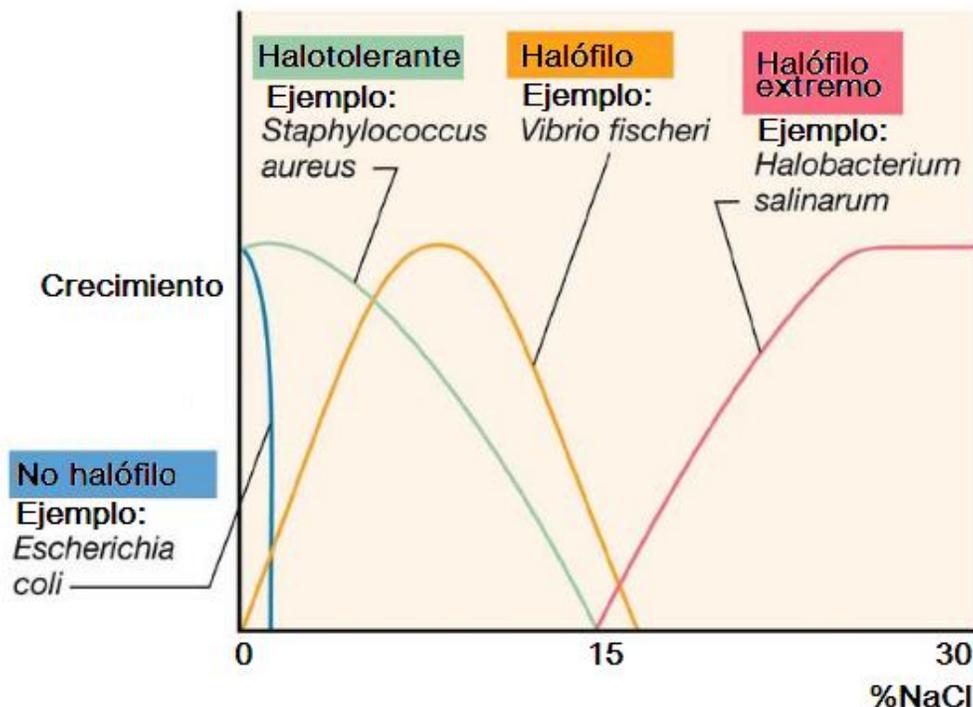


Fig. 3.1.2. Crecimiento bacteriano en función a la concentración de sal. (Imagen disponible por <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia>. Última fecha de acceso: 24/02/2012).

No obstante, algunos autores también utilizan el término halófilos débiles para designar a aquellos microorganismos que viven en ambientes con una salinidad próxima a la del agua de mar (óptimo entre 2 a 5% de NaCl). Adicionalmente, existe un grupo de organismos

denominados halotolerantes, que aunque habitualmente viven mejor sin sal, admiten cierta concentración de ella en su medio ambiente, un ejemplo de estos es *S. aureus* (8). Algunas bacterias halófilas crecen mejor con $a_w = 0.80$.

En la mayoría de los quesos, la concentración de sal se sitúa entre 4-5% (4).

Acidez y potencial de hidrógeno

La lactosa es el principal azúcar que se encuentra en la leche, y es un disacárido compuesto de un residuo de glucosa y uno de galactosa unidos por enlace β 1-4 tal como se esquematiza en la Figura 3.1.3:

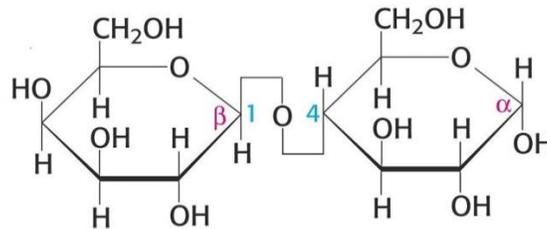


Fig. 3.1.3. Estructura de la lactosa.

(Imagen disponible por <http://www.uhu.es/prochem/wiki/images/8/87/Lactosa.jpg>. Última fecha de acceso: 24/02/2012)

Aproximadamente el 96% de la lactosa en la leche se encuentra en el suero como lactosa o lactato, sin embargo, la cuajada fresca contiene una considerable cantidad de este azúcar, cuya fermentación tiene un efecto significativo sobre la calidad del queso. La concentración de lactosa en la cuajada fresca depende de su contenido de humedad, el grado de fermentación antes de moldear, y si la cuajada se lava con agua o no (6).

Al inicio del proceso de elaboración del queso, los cultivos iniciadores de bacterias ácido lácticas (BAL) crecen rápidamente para producir ácido láctico a partir de lactosa. Las BAL iniciadoras pueden ser identificadas como aquellas cepas que producen suficiente ácido láctico para reducir el pH de la leche a menos de 5.4 en 6 horas a 30-37°C. Ejemplos de éstas son bacterias del género *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*.

Las BAL no iniciadoras son lactobacilos y pediococos mesófilos que representan gran proporción de la microbiota en muchas variedades de quesos durante su maduración. No son parte de la microbiota iniciadora que se utiliza normalmente a nivel industrial, generalmente no crecen bien en leche y no contribuyen a la producción de ácido. Su papel tiene que ver estrictamente con la maduración del queso debido a sus actividades proteolítica, lipolítica y antagónica con otros microorganismos no deseables y su potencial probiótico (9).

Puesto que las BAL no contienen un sistema de citocromo funcional, su metabolismo de los azúcares es fermentativo y la producción de ATP ocurre por fosforilación a nivel de sustrato en lugar de fosforilación oxidativa. A pesar de su falta de un sistema del citocromo, la mayoría de

BAL son aerotolerantes y crecen muy bien en presencia de aire, aunque no pueden desarrollarse sin la presencia de un azúcar que sirva como fuente de energía.

La fermentación de los azúcares en las BAL puede ocurrir por la vía de la glucólisis o por la vía de fosfoacetolasa (PK). El lactato es el producto final de la glucólisis, mientras que el lactato, etanol y CO₂ son los productos finales de la vía de PK (6).

El ácido láctico contiene un carbono asimétrico y por lo tanto, puede existir como isómero D y L (Figura 3.1.4.)



Fig. 3.1.4. Estructura del D-ácido láctico (izquierda), y el L-ácido láctico (derecha).

El isómero del lactato producido es útil en la identificación de los diversos géneros y especies de cultivos iniciadores de BAL. Por ejemplo, *Leuconostoc* y *L. delbrueckii* producen sólo el isómero D, *Lactococcus* y *S. thermophilus* produce sólo la forma L, y *L. helveticus* produce una mezcla de los isómeros D y L, debido a la presencia de dos deshidrogenasas de lactato en la célula.

Antes de que la lactosa pueda ser metabolizada, debe ser transportada dentro en la célula. Las BAL iniciadoras pueden utilizar dos sistemas diferentes para este fin: la permeasa y la fosfotransferasa (PTS), los cuales requieren de energía.

La energía para el sistema de permeasa se deriva del ATP, y la lactosa se transporta sin ser transformada. En el sistema PTS, la energía se deriva del fosfoenolpiruvato (PEP) en una serie compleja de reacciones que involucran a dos enzimas, la EI y la EIII, y una proteína estable al calor, HPr. Durante el transporte, el fosfato de alta energía en el PEP se transfiere a la lactosa para formar lactosa-fosfato (lactosa-P) en lugar de lactosa. *Lactococcus* es el único BAL que utiliza el sistema PTS para el transporte de la lactosa, mientras que el resto de los microorganismos presentes en cultivos iniciadores utilizan el sistema de permeasa.

La enzima inicial involucrada en el metabolismo de la lactosa depende del sistema de transporte utilizado. En el sistema PTS, la lactosa-P se hidroliza por la fosfo-β-galactosidasa (P-β-gal) en glucosa y galactosa-6-P, mientras que en el sistema de transporte permeasa, la lactosa es transportada intacta y es hidrolizada por la β-galactosidasa (β-gal) en glucosa y galactosa.

En los lactococos, la fermentación de la glucosa es por la vía glucolítica y la galactosa-6-P se metaboliza a través de derivados de tagatosa, gliceraldehído-3-P y dihidroxiacetona fosfato (6).

Los productos de ambas vías son muy diferentes. En la glucólisis, un mol de lactosa se transforma en 4 moles de ácido láctico (ó 2 en el caso de las cepas que excretan la galactosa), mientras que en la vía de PK, un mol de lactosa se transforma en 2 moles de cada metabolito: lactato, etanol y CO₂.

La producción de ATP por la fermentación es mucho menos eficiente que la producción por vía respiratoria. En la glucólisis, se producen 4 moles de ATP por cada mol de lactosa fermentada, en comparación con un posible de hasta 76 moles producidos por vía respiratoria, por lo tanto, para producir la misma cantidad de ATP por fermentación, como por la respiración, se requiere de una gran cantidad de azúcar, lo que se traduce en grandes cantidades de ácido láctico producido por BAL.

El crecimiento de algunas cepas de lactococos en presencia de galactosa o niveles bajos de glucosa conduce a la producción de otros compuestos a partir del piruvato, además de lactato, tales como etanol, acetato y acetaldehído (Figura 3.1.5).

Los productos finales de la fermentación de la lactosa son principalmente ácidos y, a menos que se excrete, acidifica el citoplasma de la célula, por esta razón, las BAL tienen dos mecanismos para excretar lactato y protones. Uno de ellos implica la proteína transmembranal F_0F_1 -ATPasa y es responsable de la secreción de protones. El segundo consiste en la secreción simultánea de aniones lactato y protones en simporte unos con otros. Este mecanismo se utiliza sobre todo cuando la concentración de lactato externa es baja y la concentración interna es alta, lo que permite la creación de una fuerza protón-motriz.

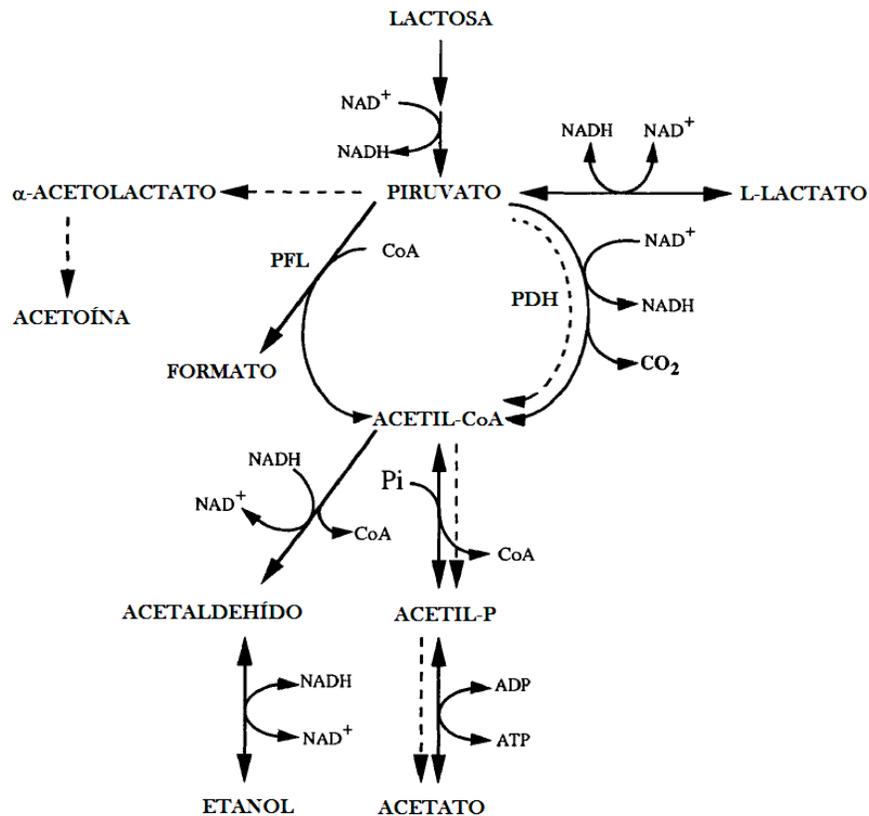


Fig. 3.1.5. Rutas del metabolismo de piruvato en bacterias ácido lácticas

Las variaciones en la concentración de lactosa en la cuajada afectan el pH final del queso, modificando su textura, la actividad enzimática, el desarrollo de la microbiota no iniciadora así

como el sabor característico a queso por alteraciones en la concentración de los ácidos orgánicos como el láctico y el acético.

Si la concentración de lactosa en la cuajada es demasiado alta, la concentración de Ca-lactato supera su límite de solubilidad y se cristaliza en la superficie del queso. Para evitar este defecto y controlar el pH final del producto, la concentración de lactosa en la cuajada de diversas variedades como Gouda y Edam, se reduce mediante la sustitución de una parte del suero con agua caliente. En estos quesos de cuajada lavada, el desarrollo de sabor es más lento.

Otra consecuencia importante derivada de la presencia de lactosa residual o de sus componentes monosacáridos en el queso es que puede ocasionar pardeamiento no enzimático o de Maillard, sobre todo si el queso se calienta (por ejemplo, como un ingrediente alimentario). La lactosa por sí misma es poco probable que sea un problema, excepto cuando se utiliza la cuajada de queso muy joven para elaborar queso fundido.

Es más probable que el pardeamiento no enzimático sea un problema en los quesos elaborados con microorganismos termófilos, donde la galactosa residual puede causar oscurecimiento indeseable en quesos como el Mozzarella, que se somete a calentamiento considerable durante la cocción de alimentos como la pizza; así como en quesos rallados como el Parmesano y el Grana, que tienen un bajo contenido de humedad y cuya actividad de agua es óptimo para reacción de Maillard (~ 0.6). La presencia de carbonilos (por ejemplo, el diacetilo), que son muy activos en la reacción de Maillard también favorecen el oscurecimiento (6).

Potencial redox y presencia de oxígeno

Otro parámetro de importancia es el potencial redox o potencial de oxidación-reducción (redox), mismo que se expresa en milivoltios (mV) y se designa como "Eh". En este sentido, la oxidación es la pérdida de electrones, mientras que la reducción es sinónimo de ganancia de electrones. La pérdida o ganancia de electrones puede o no incluir la transferencia de oxígeno o hidrógeno.

El potencial redox de un sistema está determinado por la cantidad total de especies oxidantes y reductoras ($[Ox]+[Red]$) (10). El valor de Eh generalmente se mide utilizando un electrodo de platino acoplado a un electrodo de referencia de calomel. Valores positivos indican un ambiente oxidativo, mientras que valores negativos indican un ambiente o estado reductor (11).

La leche fresca obtenida en condiciones normales, exhibe un potencial medido con electrodo de oro o de platino de entre +200 y +300 mV que se atribuye principalmente a la cantidad de oxígeno disuelto. En el momento de la secreción, la leche se encuentra prácticamente libre de oxígeno, pero después de que se ha establecido un equilibrio con el aire, se incorpora alrededor de 0.3 mmol de O_2/L . La remoción del oxígeno mediante burbujeo con nitrógeno disminuye el potencial hasta valores de -120 mV.

Cuando se presenta crecimiento bacteriano en la leche, el potencial redox en general, tiende a disminuir hacia valores negativos. Un cambio rápido en este parámetro suele ocurrir cuando las bacterias aerobias han consumido gran parte del oxígeno disuelto.

Ninguno de los componentes principales de la leche, además del agua, como son el material lipídico, azúcares y proteínas, tiene influencia sobre el potencial redox. Las especies responsables de establecer el valor de Eh en el sistema son lactato-piruvato, ascorbato y riboflavina (10).

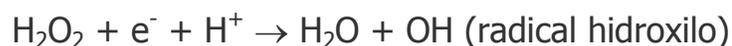
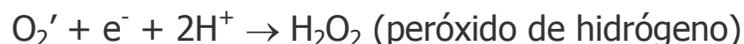
El potencial redox es modificado en alimentos fermentados debido al metabolismo de microorganismos involucrados con el desarrollo de sabores y olores característicos. En queso está bien establecido que la anaerobiosis y el decremento del Eh participan en el desarrollo balanceado de sabor (12).

No está claro el mecanismo exacto mediante el cual el potencial redox en queso disminuye, pero es muy probable que se relacione con la fermentación de lactosa a ácido láctico durante el desarrollo de microorganismos iniciadores, así como con la reducción de pequeñas cantidades de O₂ a H₂O. Debido a este tipo de reacciones es que los quesos (en particular aquellos que sufren algún grado de madurez) son esencialmente sistemas anaerobios en los cuales se desarrollan fácilmente microorganismos anaerobios o anaerobios facultativos. El valor típico de Eh de un queso madurado es de aproximadamente -240 a -250 mV (6).

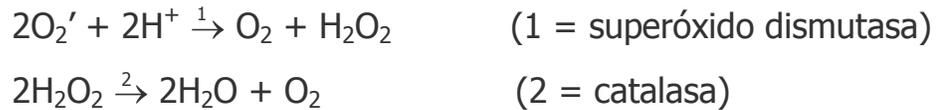
Según las necesidades de oxígeno los microorganismos se clasifican en:

- Aerobios estrictos: Requieren oxígeno para desarrollarse, no se multiplican en ambientes anaerobios. Ejemplo: especies de los géneros *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, y hongos.
- Anaerobios estrictos: Microorganismos que solo crecen en atmósferas con una tensión de oxígeno inferior a 0.5%. Ejemplo de estos son *Clostridium* y *Propionibacterium*.
- Anaerobios facultativos: No necesitan oxígeno para su desarrollo normal, pero si está presente lo pueden utilizar metabólicamente, es decir que crecen bajo condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas utilizando el oxígeno como aceptor final de electrones. Ejemplos de estas son *Escherichia coli* y bacterias del género *Staphylococcus*.
- Microaerofilos: Crecen en presencia de tensiones de oxígeno mínimas y lo metabolizan utilizándolo como aceptor final de electrones. Ejemplo: *Lactobacillus* y *Streptococcus*.
- Anaerobias aerotolerantes: Toleran el oxígeno hasta un 8% pero son incapaces de utilizarlo para su metabolismo. Ejemplo de estos son algunas especies de clostridias como *Clostridium carnis*, *Clostridium histolyticum* y *Clostridium tertium*.

La tolerancia al oxígeno de estas bacterias está dada por la presencia de enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y peroxidasa que catalizan la conversión de radicales superóxido a peróxido de hidrógeno, menos tóxico, y a oxígeno molecular. Las reacciones son las siguientes:



Estos productos son extremadamente tóxicos porque son agentes oxidantes poderosos y provocan destrucción de constituyentes celulares rápidamente. Los neutrófilos y macrófagos utilizan estos productos tóxicos del O₂ para destruir los patógenos invasores. Muchos microorganismos poseen enzimas que los protegen de estos productos tóxicos del oxígeno que catalizan las siguientes reacciones:



Los organismos anaerobios estrictos carecen totalmente de estas enzimas (13).

En alimentos no homogéneos, el valor de potencial redox puede variar de forma importante de un sitio a otro debido a cambios en la concentración de pares de especies redox o nutrientes. Los gradientes de Eh pueden generarse de la superficie al centro del alimento cuando la difusión de gases en el mismo se encuentra restringida. Como consecuencia, los microorganismos aerobios estarán limitados a crecer en la superficie del producto cuando éste tiene una composición heterogénea (12).

El papel del calcio

El calcio y el fosfato afectan casi todos los aspectos de la producción de queso. La concentración de Ca⁺⁺ y PO₄³⁻ en la leche es de cerca de 117 y 203 mg/100g, de los cuales aproximadamente 68 y 46%, respectivamente, están en forma insoluble a pH 6.6. Este calcio y fosfato enlazados se transfieren a la cuajada pero se disuelven gradualmente a medida que baja el pH; por ejemplo, a pH 5.3, que es muy similar al pH de quesos tales como Cheddar, Chihuahua, Mozzarella y Oaxaca al final de su fabricación, prácticamente todo el fosfato de la leche está solubilizado, mientras que cerca del 14% del calcio sigue presente dentro de las micelas de caseína (14).

Más allá de los cambios estructurales, el contenido final de calcio y fosfato en un queso contribuye significativamente al rendimiento. Por ejemplo, estos minerales representan cerca del 1.6 % de la masa del queso Cheddar y cerca del 1.9 % de la masa del queso Gouda. Si se eliminaran, el rendimiento calculado a humedad constante disminuiría cerca de 2.9 y 3.2 %, respectivamente (15).

Los quesos blancos elaborados sin fermentos ni acidificación de otro tipo (a pH alrededor de 6.2-6.5) retienen en proporción mayor cantidad de estos minerales que un queso Gouda y, en el otro extremo, quesos altamente ácidos como el Cottage y el Quarg retienen menor proporción que un queso Cheddar (16).

La adición de calcio en forma de CaCl₂ aumenta ligeramente la firmeza mecánica de la cuajada, siempre y cuando la concentración no sea mayor de 10 mM, equivalente a 40 g de calcio/100 L

de leche. En ausencia de tratamientos térmicos especiales, lo usual es añadirle a la leche 20 g de cloruro de calcio/100 L, que equivale a cerca de 7 g de calcio/100 L. Por otro lado, la acidificación de la leche aumenta la actividad de los iones Ca^{++} , disminuyendo el tiempo de coagulación y aumentando también la firmeza mecánica de la cuajada (14).

El efecto inicial del corte en la κ -caseína es una reducción drástica en la carga eléctrica negativa de la superficie de las micelas, que permite el acercamiento entre sí de las micelas modificadas y facilita así la segunda fase de su agregación para formar un gel. En esta fase de formación de la estructura básica, el calcio juega un papel importante como acelerador del proceso (16).

La actividad del ion Ca^{++} aumenta la sinéresis, mientras que el fosfato de calcio coloidal disminuye la sinéresis. Por supuesto, la disminución de pH causa disolución del fosfato coloidal y un aumento en la actividad del Ca^{++} . Por eso, si la leche ha sido acidificada antes de cuajarla, la velocidad de sinéresis es mayor (17).

Proteínas constitutivas del queso

El coágulo producido por la acción del cuajo es una entidad dinámica, que en términos estrictos nunca alcanza un estado final de equilibrio. El proceso mediante el cual la cuajada va adquiriendo firmeza, involucra la formación de interacciones entre las micelas de caseína, dando lugar a una red cada vez más fuerte, lo que hace que el gel proteínico se encoja gradualmente, expulsando lactosuero y atrapando y distorsionando los glóbulos de grasa. (16).

La leche bovina contiene dos grupos de proteínas marcadamente diferentes: las caseínas, que son fosfoproteínas (contienen grupos fosfato esterificados a residuos de serina), insolubles a pH 4.6 y 20°C; y las proteínas del suero que sí son solubles a este pH. Las primeras representan aproximadamente el 80% del nitrógeno total, y dentro de ellas se distinguen 4 tipos principales denominados caseínas primarias: α_{s1} , α_{s2} , β y κ en una relación 40:10:35:12 aproximadamente (18).

El segundo grupo se encuentra en el suero de la leche, que contiene aproximadamente 0.6% de proteínas, constituidas por β -lactoglobulina (54%), α -lactoalbúmina (21%), seralbúmina (10%), inmunoglobulinas y otras proteínas. Los componentes del suero son proteínas globulares que están libres en solución acuosa, presentan estructuras cuaternarias, son insensibles al Ca^{++} y no están fosforiladas.

Las caseínas de la leche se encuentran en forma de micelas que a su vez están constituidas de submicelas. El núcleo de estas últimas está compuesto de α_{s1} , α_{s2} y β -caseínas, las cuales son notablemente hidrofóbicas. La κ -caseína es la responsable de estabilizar la micela, pues forma una capa hidrofílica alrededor del núcleo. Ésta se encuentra en cantidades variables principalmente en la superficie de la submicela; así aquellas submicelas deficientes de κ -caseína están localizadas en el centro de las micelas, mientras que las ricas están concentradas en la superficie.

Las submicelas están unidas entre sí por microcristales de fosfato de calcio, puentes de hidrógeno, y probablemente por enlaces hidrofóbicos. Todas las caseínas, especialmente la β , tienen altos niveles de prolina, que evita la formación de estructuras secundarias y terciarias, lo que tiene como consecuencia que sean más susceptibles a proteólisis, hecho que juega un papel importante en la maduración del queso (6).

De acuerdo a lo publicado en el libro de Reglas de Uso, elaborado por la organización Queso Cotija, Región de Origen, el cuajo adicionado a la leche cruda desnatada o no, debe ser natural, de origen animal, elaborado higiénicamente por los mismos productores de queso, a partir del cuajo de rumiantes jóvenes; o en su defecto, se podrá utilizar cuajo comercial que no sea de origen microbiano cuya composición corresponda a la mezcla enzimática proveniente del extracto de estómago de rumiantes (19).

Entre las proteasas que se adicionan en forma de cuajo, las principales son quimosina y pepsina, responsables de la primera fase de la coagulación de la leche, a la que se le llama fase enzimática, y que consiste en la hidrólisis de la κ -caseína en el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆, rindiendo dos péptidos de distinto tamaño: el segmento 1-105 corresponde a la κ -paracaseína ligada a las caseínas α_s y β , permanece integrada dentro de la micela pero ha perdido la propiedad estabilizante en presencia de calcio que caracteriza a la κ -caseína íntegra; y el segmento 106-169 llamado caseinomacropéptido es el que se separa de la micela, es polar, poco estable y contiene todas las modificaciones postraduccionales de la κ -caseína original (fosforilaciones y glucosilaciones de N-acetil galactosamina, galactosa y ácido N-acetil murámico formando cadenas de 3 o 4 unidades).

Alrededor de un 34% de la κ -caseína no está glucosilada, y el resto se glucosila al azar, lo que genera microheterogeneidad cuando se somete a electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras. El grado de glucosilación disminuye la eficiencia de la κ -caseína como sustrato para la quimosina. Sólo una fracción de las caseínas se hidroliza durante la primera etapa de la coagulación (18).

La liberación del caseinomacropéptido y su paso al suero (debido a su composición de aminoácidos y su contenido de azúcares que lo hace fuertemente polar), determinan una disminución importante de la carga de las micelas así como posiblemente su grado de hidratación, pudiendo establecer enlaces intermicelares por interacciones hidrofóbicas entre restos de κ -paracaseína y la formación de puentes salinos por interacción con el calcio que conducen a la formación del gel (4).

Los pesos moleculares de las caseínas que forman parte del macrocomplejo micelar tienen los valores expuestos en la Tabla 3.1.1.

Tabla 3.1.1. Pesos moleculares de las diferentes tipos de caseínas presentes en la leche de vaca (4).

	α_{s1}	α_{s2}	β	κ
Peso molecular (kDa)	23.6	25.2	24.0	19.0

Las γ -caseínas son componentes minoritarios del sistema de caseínas. Se trata de fragmentos del extremo carboxilo terminal de la β -caseína producidos por la acción de la plasmina (enzima

proteolítica endógena de la leche). El fragmento amino terminal es conocido como fracción proteosa-peptona (6).

Como ya se mencionó, el análisis de caseinomacropéptido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de agentes reductores y desnaturalizantes (PAGE-SDS), muestra la aparición de un grupo de bandas en un estrecho intervalo de valores de peso molecular aproximadamente de 18 kDa que excede el valor esperado de 6.5 kDa debido a la voluminosa naturaleza de su parte glucosídica. La κ -paracaseína se esperaría observar con un peso molecular aproximado de 13.5 kDa cuando no se encuentre asociada a α y β caseínas (18).

En un perfil electroforético de proteínas extraídas de queso se esperaría observar todos los tipos de caseínas en diferentes proporciones (incluyendo κ -caseína residual) y otros péptidos de menor peso molecular producto de la hidrólisis de las mismas. Además, podrían encontrarse en menor proporción proteínas del suero como α -lactoalbúmina (14.4 kDa), β -globulinas (18.3 kDa), seroalbúminas (66.2 kDa) e inmunoglobulinas de alto peso molecular (20).

Enzimas proteolíticas de origen microbiano

Las enzimas proteolíticas o proteasas son un grupo de biocatalizadores capaces de romper el enlace peptídico de las proteínas. Estas enzimas se clasifican en función al sitio por el cual cortan la cadena peptídica en:

- Endopeptidasas o proteinasas, que hidrolizan las proteínas en sitios específicos dentro de la cadena de aminoácidos, produciendo péptidos de distintos tamaños.
- Exopeptidasas o peptidasas, que actúan en la zona final de la cadena polipeptídica rompiendo ya sea en el extremo amino terminal originando la liberación de aminoácidos libres (aminopeptidasas), dos aminoácidos (dipeptidasas) o de tres aminoácidos (tripeptidasas); o pueden actuar rompiendo por el extremo carboxilo terminal liberando igualmente un único aminoácido (carboxipeptidasas) o dos aminoácidos (peptidil-dipeptidasas).

Las endoproteasas se pueden dividir teniendo en cuenta su mecanismo catalítico o sustrato específico: serina-, cisteína-, aspártico-, carboxi- y metalo-endopeptidasas.

Un ejemplo de serin-proteasa es la plasmina, que degrada principalmente la caseína β rindiendo caseínas γ y la fracción proteosa-peptona; y un ejemplo de endopeptidasas son las enzimas coagulantes del cuajo, conformado por quimosina (80%) y pepsina (20%) (4).

Las proteasas son utilizadas por los microorganismos para degradar las proteínas del medio y así obtener nutrientes para su crecimiento. La degradación es iniciada por endopeptidasas secretadas al medio, seguida de una nueva hidrólisis por exopeptidasas extra o intracelulares (21). A lo largo de la maduración, los microorganismos liberan en la cuajada enzimas extracelulares y enzimas intracelulares al momento de morir (4).

Proteólisis en queso

La proteólisis es el principal factor responsable de los cambios de textura y de la mayor contribución de sabor y aroma del queso. Desafortunadamente, cuando la proteólisis es excesiva, puede llegar a producir péptido pequeños que dan notas amargas, y que si llegan a presentarse en concentraciones significativas darán lugar a un defecto común en quesos (6).

Los principales agentes involucrados en la proteólisis del queso son:

- Las enzimas nativas de la leche (tales como la plasmina y la proteasa ácida), las cuales son particularmente importantes en quesos elaborados con leche bronca,
- Las enzimas del cuajo (quimosina, pepsina o proteasas de origen microbiano),
- Las enzimas provenientes de cultivos iniciadores, y las de los cultivos no iniciadores (22).

Durante la maduración del queso, las caseínas son atacadas por proteasas que dan lugar a péptidos, que a su vez son sustrato para otras proteasas y peptidasas, dando lugar a péptidos cada vez más pequeños y aminoácidos, que por medio de reacciones químicas y metabólicas darán lugar a compuestos de sabor tales como ácido fenilacético, metiltiol, feniletanol y otros compuestos de tipo cetónico (23)

Las enzimas de origen microbiano desempeñan el papel más importante en la maduración, ya que la cantidad de microorganismos en el queso es elevada, especialmente en aquellos elaborados con leche cruda. Los microorganismos que llevan a cabo tanto hidrólisis de proteínas como fermentación ácida son los llamados ácido-proteolíticos tales como *Enterococcus faecalis* y *Micrococcus caseolyticus* (24).

En la Figura 3.1.6 se ilustra el perfil electroforético de varios quesos madurados. Al compararse se observan diferencias debidas a la variedad de microorganismos presentes en cada uno de ellos.

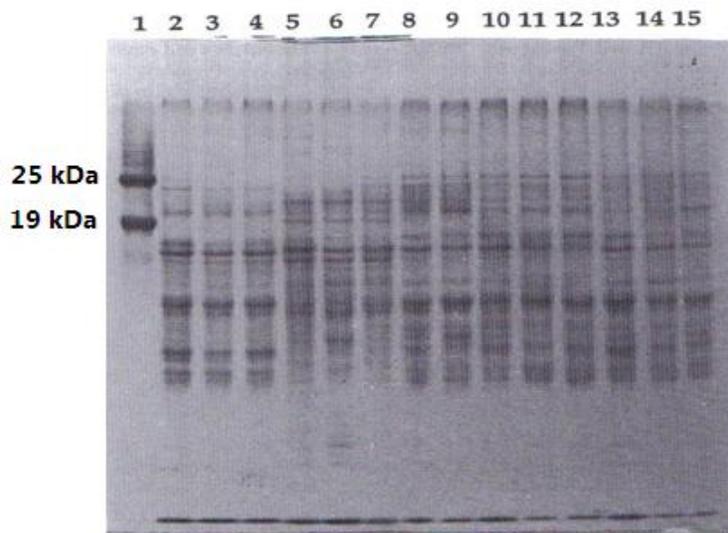


Fig. 3.1.6. Electroforesis de urea-PAGE de la fracción soluble de distintos quesos: 1) caseinato de sodio, 2-4) Cheddar, 5-7) Emmental, 8) Massdamer, 9) Jarlsberg, 10-12) Edam, 13-15) Gouda (6).

Si se observa detenidamente la imagen, es posible identificar diferencias en los perfiles electroforéticos entre muestras del mismo tipo, sobre todo entre 20-25 kDa, así como bandas que son comunes en todos los carriles y que aparecen preferentemente debajo de los 20 kDa. Esto implica grados y patrones de degradación distintos aún entre quesos del mismo tipo.

En especies de bacterias ácido lácticas (BAL) tales como *L. lactis*, *L. bugarius*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus* y *L. helveticus*, se han encontrado peptidasas prolino específicas capaces de liberar oligopéptidos ricos en prolina a partir de caseína. *E. faecalis* produce una proteasa exocelular. En cuanto a *E. faecium* y *E. durans*, ambos están dotados de actividad extracelular comparable con la de los estreptococos lácticos (25).

Lipólisis en el queso

Cuando un alimento es rico en material graso, los triacilgliceroles puros causan una sensación grasosa en la boca carente de sabor en el sentido estricto. Sin embargo, los lípidos tienen un efecto importante en el sabor y la textura de los alimentos al que contribuyen de tres formas distintas:

1. Son fuente de ácidos grasos libres (AGL), especialmente de ácidos grasos de cadena corta que tienen sabor y olor característicos bien definidos. Estos ácidos grasos se producen mediante la acción de lipasas.
2. Los ácidos grasos, especialmente aquellos poliinsaturados son susceptibles de oxidación, lo que lleva a la formación de varios aldehídos insaturados que son los responsables de sabores amargos que se consideran como defecto y que son característicos de la rancidez oxidativa. La oxidación en quesos parece estar limitada probablemente debido al bajo potencial redox característico del mismo (hasta -250 mV).
3. La fracción lipídica funge además como solvente de compuestos de sabor y olor producto no sólo de los lípidos, sino del metabolismo microbiano de proteínas y lactosa.

De las posibles contribuciones de los lípidos al perfil de sabor del queso, la lipólisis y modificación de los ácidos grasos resultantes son los fenómenos más significativos.

Las lipasas del queso pueden provenir de la leche, de la preparación de cuajo (pasta) y de bacterias del cultivo iniciador o no iniciador. En general, la lipólisis se acentúa más en variedades de queso en los que hay mohos involucrados en la maduración en comparación de aquellos en los que es mediada principalmente por bacterias, esto debido posiblemente ya sea a la excreción de una mayor cantidad de enzimas o debido a que las mismas son más eficientes en el primer caso (6).

Lipasas y lipólisis

Las lipasas son hidrolasas capaces de romper enlaces éster de ácidos carboxílicos. Éstas tienen efecto mínimo sobre ésteres solubles, es decir, prefieren actuar en la interface aceite-agua de ésteres emulsificados.

Las lipasas pueden exhibir varios tipos de especificidad: Usualmente son específicas para los enlaces éster exteriores del tri o diglicérido (posiciones sn1 y sn3). Inicialmente se hidrolizan los triglicéridos a 1,2- y 2,3-diglicéridos y por último a los 2-monoglicéridos. El ácido graso prevaleciente en la posición sn2 migra a cualquiera de las posiciones vacantes en sn1 ó sn3 para ser luego liberado por la lipasa (Figura 3.1.7.). En la mayoría de los quesos, la lipólisis probablemente no va más allá del primer paso (6).

Las lipasas generalmente presentan especificidad por ácidos grasos de cierta longitud. Algunas otras lipasas hidrolizan específicamente el enlace éster que une ácidos grasos insaturados.

Lactococcus spp. y *Lactobacillus* spp. tienen niveles más bajos de actividad lipolítica que otras bacterias como *Pseudomonas*. La actividad lipasa y esterasa de las bacterias ácido lácticas parece ser intracelular en su totalidad, con actividad máxima a pH 6-8 y a 37°C. Estas lipasas no presentan actividad sobre triacilglicerolos que contengan ácidos grasos de cadena larga (mayor a 10 carbonos).

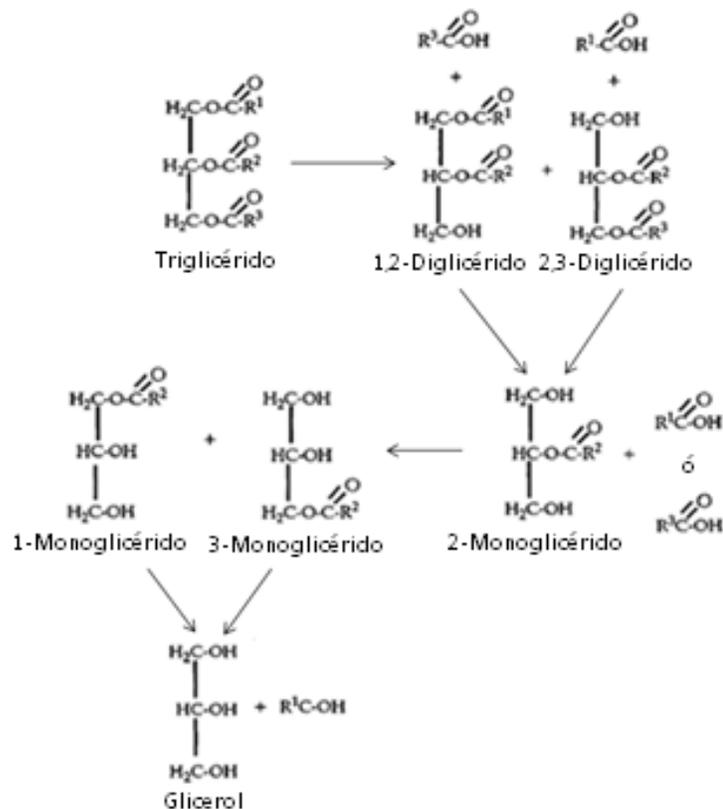


Fig. 3.1.7. Acción de lipasas sobre acilglicerolos (6).

Micrococcus, que constituye parte de la microbiota no iniciadora en quesos, especialmente en la superficie, produce lipasas que pueden contribuir a la lipólisis durante la maduración. La microbiota no iniciadora de queso puede incluir también a *Pediococcus* spp. que es débilmente esterolítica y lipolítica.

En la Tabla 3.2.1. se presentan algunos ejemplos de la proporción de ácidos grasos libres (AGL) en quesos madurados.

Tabla 3.2.1. Concentración de ácidos grasos en algunas variedades de queso madurado (6).

Variedad	Ácidos grasos libres (mg/kg)
Edam	356
Mozzarella	363
Camembert	681
Cheddar	1,028
Gruyère	1,481
Provolone	2,118
Parmesano	4,993
Roquefort	32,453

La proporción de AGL en cada tipo de queso es variable. Entre mayor proporción de AGL haya en un producto es más probable que predomine la actividad lipolítica sobre la actividad de degradación de los mismos que lleva a la formación de alcoholes, lactonas y ésteres. Por el contrario, una baja proporción de AGL implicaría ya sea una baja actividad lipolítica o una alta degradación del producto de hidrólisis. El equilibrio entre estas dos actividades (liberación de AGL y su degradación a otros compuestos), incidirá directamente sobre el tipo de producto en cuanto a perfiles de sabor, olor y textura.

Los compuestos volátiles que aportan al perfil de aroma y sabor del producto son de naturaleza muy variada y se han identificado cientos de ellos. Los ácidos grasos de cadena corta tienen un impacto considerable en las características finales al originar aromas deseables, pero la lipólisis intensiva y desmedida puede causar problemas de rancidez. Estos ácidos grasos son sustrato de reacciones enzimáticas como la β -oxidación y descarboxilación, mediante las cuales se producen metilcetonas y alcoholes secundarios, y por esterificación de hidroxiacidos se producen lactonas. Adicionalmente los ácidos grasos pueden reaccionar con grupos alcohol y formar ésteres tales como el etilbutanato, etilhexanato o metildecanoato (Figura 3.1.8).

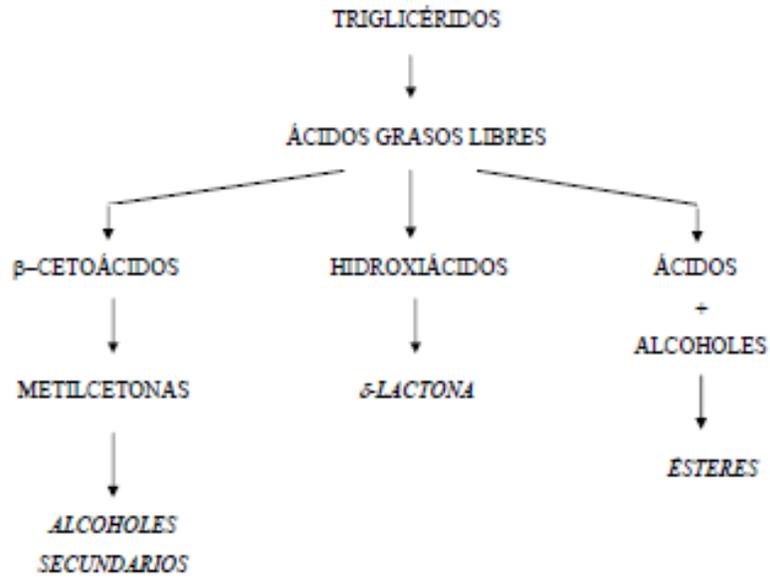


Fig. 3.1.8. Reacciones químicas que ocurren durante la maduración del queso a partir del material lipídico (23).

3.2. Microbiota bacteriana del queso Cotija

Las bacterias empleadas en cultivos iniciadores realizan una o más de las siguientes funciones:

1. Metabolismo de la lactosa. La producción de ácido láctico merma en el desarrollo de microorganismos patógenos y de descomposición en el queso.
2. Producción de otros compuestos antimicrobianos que disminuyen aún más la probabilidad de sobrevivencia y proliferación de patógenos.
3. Producción de compuestos responsables de sabor que contribuyen a las propiedades sensoriales del alimento.
4. Producción de una amplia gama de enzimas proteolíticas que juegan un papel activo en la generación del perfil de sabor durante la maduración del queso.
5. Presencia de microorganismos que puedan promover las propiedades funcionales del queso.

Estas propiedades tienen un impacto significativo en las características del producto final, sobretodo en cuanto al perfil de sabor. Por ejemplo, la cantidad de ácido láctico producido durante la maduración determinará el grado de pérdida de humedad, el pH final y la cantidad de lactosa residual en el queso (10).

En quesos elaborados con leche cruda, el cultivo iniciador no está precisamente descrito, pues se compone de la mezcla de microorganismos característicos de la región y depende del manejo que se le da a la materia prima así como de las medidas de higiene y buenas prácticas con las que se elabora el producto.

Antecedentes dentro del grupo de trabajo

En 2006, García-Saturnino trabajó con microorganismos con actividad lipolítica, basando su estudio en el aislamiento y caracterización de bacterias y levaduras por medio de la secuenciación parcial del gen ribosomal 16S y por pruebas bioquímicas. Las muestras de las que se partió en este trabajo fueron de queso Cotija con un tiempo de maduración superior a 6 meses y en algunos casos superior a un año, donde se lograron identificar por secuenciación a las bacterias: *Bacillus pumilus*, y *Staphylococcus xylosum*, *S. piscifermentans*, *S. condimentii*, *S. carnosus* y *S. saprophyticus*; y por pruebas bioquímicas *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus xylosum*, *S. simulans* y *S. saprophyticus*. Todos los microorganismos fueron capaces de metabolizar ácidos grasos de cadena corta así como de cadena larga (26).

En el 2007, Hernández-Mejía, realizó el aislamiento y caracterización de bacterias proteolíticas por métodos moleculares (amplificación, análisis por ARDRA y secuenciación de la región V3 del ADNr 16S) en queso Cotija rendido (más de 6 meses de maduración), añejo (de 3 a 6 meses de maduración) y oreado (menos de 3 meses de maduración). En este trabajo, únicamente en el primer tipo de muestra se pudieron aislar colonias, que resultaron pertenecer a *Staphylococcus*

sciuri, *S. lentus*, *S. fleurettii* o *S. xylosum*; así como a *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* o *flexus* y *Enterococcus faecalis* (27).

Un año después, Bravo-Mendoza trabajó con queso Cotija recién elaborado y simuló las condiciones de maduración para monitorear la evolución de la microbiota en la muestra. Después de alrededor de 2 meses y medio de maduración, se aislaron y caracterizaron por pruebas bioquímicas cepas de bacterias ácido lácticas. Los resultados indicaron que las cepas pertenecían a *Lactobacillus pentosus* y *Enterococcus faecium* (1).

El análisis de la microbiota completa del queso por la técnica de PCR-DGGE fue realizada en 2009 por Zúñiga-Bustos. En este trabajo se estudió la diversidad, dominancia relativa y dinámica de desarrollo monitoreando la maduración de las piezas durante 7 meses. La técnica permitió la identificación de los géneros *Enterococcus*, *Marinilactibacillus* y *Vagococcus* (28).

En el mismo año, Estrada-Hernández llevó a cabo en su tesis de licenciatura la identificación de microorganismos patógenos mediante la técnica de PCR punto final, la cual permitió identificar en queso Cotija (con un tiempo mínimo de maduración de tres meses), la presencia de *Salmonella typhi* en dos de las diez muestras analizadas, y de *Staphylococcus aureus* en tres de ellas. Todas dieron resultados negativos para *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus* (29).

También en 2009, Cortés-Díaz trabajó con diez muestras de queso Cotija que cumplían con el tiempo mínimo de maduración para salir a la venta (3 meses), las cuales fueron analizadas con el fin de detectar bacterias ácido lácticas (BAL) por amplificación por PCR de distintos genes. Las bacterias del género *Lactobacillus* se encontraron con una frecuencia del 100% en las muestras, *Enterococcus faecium* en un 70% y *Lactococcus lactis* en el 30% de las muestras. *Streptococcus thermophilus* no se detectó en ninguna (30).

Para el año 2010, la búsqueda de bacterias ácido lácticas halófilas en muestras de queso y sal se realizó por Gómez-Castelo. En su trabajo de tesis de licenciatura reportó la identificación por PCR-DGGE de los géneros *Enterococcus*, *Vagococcus* y *Lactobacillus* (31).

Características generales de los microorganismos identificados

A continuación se presenta una revisión de las características de los microorganismos identificados en queso Cotija.

I. Género *Bacillus*: son bacilos Gram positivos, esporulados, dependiendo de la especie aerobios o anaerobios facultativos. Si bien la mayoría son mesófilos, los hay psicrótrofos y termófilos. El género incluye sólo dos patógenos: *B. anthracis* (agente causal del carbunco) y *B. cereus* (causante de infecciones alimentarias por producción de enterotoxina) (12). Frecuentemente de 0.5-1.5 X 2-6 μm , típicamente móvil. Se encuentran, por ejemplo, como saprófitos en la tierra y el agua (32). Productor característico de proteasas y peptidasas responsables de alteración en alimentos (33).

II. Género *Staphylococcus*: Cocos Gram positivos, de aproximadamente 1 μm de diámetro, frecuentemente en agrupaciones, algunos contienen pigmentos carotenoides color naranja o

amarillo; inmóviles y aerobios-anaerobios facultativos. Entre sus fuentes de carbono se encuentran varios azúcares. Se les reconoce como proteolíticos y lipolíticos. Son catalasa positivos, normalmente halotolerantes. Los estafilococos se dividen en cepas coagulasa positivos y coagulasa negativos; entre los primeros se encuentran *S. aureus* y *S. intermedius*, mientras que en las últimas está *S. epidermis*. Se encuentran por ejemplo como comensales y patógenos del hombre y otros animales (32).

Dentro de este género, se encuentra *S. aureus*, uno de los patógenos más comunes causantes de toxi-infecciones alimentarias cuya presencia se asocia directamente a una inadecuada manipulación o al empleo de materias primas contaminadas (34). Tiene una amplia gama de determinantes de virulencia, que abarca componentes de pared celular y una gran variedad de exoproteínas que contribuyen en su habilidad para colonizar y causar enfermedad en mamíferos. Sin embargo, la Food and Drug Administration (FDA) establece que la sola presencia de grandes cantidades de *S. aureus* en los alimentos no constituye evidencia suficiente para incriminar un alimento como causante de infección, sino que es necesario además, evaluar la producción de enterotoxinas en los aislados (35).

III. Género *Streptococcus*: Son cocos Gram positivos, no esporulados y es habitual encontrarlos encapsulados, anaerobios facultativos o estrictos, catalasa negativos, normalmente fermentativos, metabolizan habitualmente los azúcares formando gas. Se encuentran, por ejemplo, como comensales del hombre y otros animales.

Una identificación más precisa de los estreptococos fue creada por Rebecca Lancefield. Esta clasificación en serogrupos está basada en las diferencias antigénicas de los carbohidratos de la pared celular. Los antígenos de grupo son rápidamente extraíbles e identificables por reacciones de precipitación usando antisueros específicos. Los estreptococos que carecen de antígeno de grupo reconocible son identificados por características fenotípicas (reacciones de fermentación, producción de enzimas) y por hibridación del ADN. Los grupos de Lancefield se denominan A, B, C, hasta V (36).

Una serie de especies que anteriormente pertenecían al género *Streptococcus* han sido transferidas a otros géneros. Por ejemplo, *S. faecalis* y *S. faecium* han sido transferidas desde 1984 al género *Enterococcus* como *E. faecalis* y *E. faecium*. Éste género pertenece al grupo D de Lancefield, pueden ser α , β o no hemolíticos. Crecen normalmente a 10 y a 45°C, sobreviven a 60°C durante 30 minutos, y pueden crecer en 6.5% de sal (NaCl) y pH 9.6. *E. faecalis* puede obtener energía a partir de piruvato, citrato y malato, pero *E. faecium*, no (32).

El género *Enterococcus* constituye 28 especies de células ovoides, Gram positivas, anaerobias facultativas, producen ácido láctico sin generación de gas, normalmente de alrededor de 1 μm de diámetro que se presentan aisladas, en pares o en cadenas cortas. Al ser colonizador natural de los intestinos en el hombre, se le considera indicador de contaminación fecal. Por otro lado, se ha visto que los enterococos tienen la propiedad de producir bacteriocinas, llamadas enterocinas, las cuales son péptidos pequeños con actividad antimicrobiana contra bacterias alterantes Gram positivas relacionadas e incluso contra patógenas como *Listeria* (37).

S. lactis ha sido transferido al género *Lactococcus* como *L. lactis*. Los lactococos son células esféricas u ovoides, móviles que se encuentran aislados, en parejas o en cadenas. Crecen a 10°C pero no a 45°C. Los organismos son fermentativos, siendo el ácido L(+) láctico el principal producto de metabolismo de glucosa. Los lactococos se encuentran, por ejemplo, en productos lácteos. Han sido admitidas cuatro especies (*L. lactis*, *L. garvieae*, *L. plantarum* y *L. raffinolactis*), y tres subespecies de *L. lactis* (*lactis*, *cremoris* y *hordniae*) (12, 42). *L. lactis subsp lactis* es capaz de producir una de las bacteriocinas de amplio espectro más representativas a nivel de industria de alimentos, la nisina, que es capaz de actuar en alimentos como encurtidos, quesos y otros productos lácteos contra *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *L. monocytogenes* (38).

IV. Género *Lactobacillus*: son bacilos o cocobacilos Gram positivos, catalasa negativos que con frecuencia se presentan aislados o en cadenas largas. Normalmente no móviles. Quimiorganoheterótrofos, utilizan distintos azúcares como fuente de carbono. Característicamente fermentativos, forman ácido láctico a partir de glucosa por fermentación homoláctica o por fermentación heteroláctica sin producción de gas (32). Si bien los que se encuentran en los alimentos son microaerófilos, existen algunas cepas anaerobias estrictas, en especial en las heces del hombre y en los intestinos. Característicamente se encuentran en la mayoría de las hortalizas junto con algunas de las demás bacterias ácido lácticas, así como en el suelo, el agua, las plantas, animales, en la cavidad oral, tracto gastrointestinal y en el tracto genital femenino. Su presencia en alimentos de origen lácteo es común. Se les reconoce como probióticas.

Los miembros de este género juegan un papel predominante en la fermentación y desarrollo de sabor en muchos alimentos y bebidas tradicionales, por lo que son frecuentemente utilizados como iniciadores en productos lácteos como queso y yogurt. *Lactobacillus para paracasei* tiene la capacidad de producir bacteriocinas contra *E. coli* enterohemorrágica y *Salmonella* entérica serovar *typhi* entre otros (38).

V. Género *Marinilactibacillus*: bacilo corto Gram positivo, crece aislado, en pares o formando cadenas cortas; anaerobio facultativo, catalasa negativo, no esporulado y puede ser no móvil o móvil con flagelos peritricos, claramente halotolerante (intervalo óptimo de crecimiento a concentración de NaCl de alrededor del 2%, con un intervalo de tolerancia que va de 0 a 12-20% dependiendo de la cepa); crecen en intervalos de pH preferentemente alcalinos, pero su crecimiento se observa en pH de 6-9. El intervalo de temperatura de crecimiento se encuentra entre 37-40°C (algunos psicrotolerantes crecen hasta a -1.8 °C). Producen ácido láctico como principal producto metabólico. Este género comprende a la fecha solo dos especies: *M. piezotolerans* y *M. psychrotolerans*. Se encuentran presentes en sedimentos marinos, donde al parecer juegan un papel importante en la transformación de la materia orgánica (39, 40).

VI. Género *Vagococcus*: son cocos móviles por medio de flagelos peritricos, Gram positivos, catalasa negativos, anaerobios facultativos, productores de acidez y no formadores de esporas. Crecen aislados, en pares o formando cadenas cortas y se desarrollan a 10°C pero no a 45°C. Crecen en medios con una concentración de NaCl hasta del 4% (algunos como *V. carniphilus*

crece en medios hasta con 6.5% de NaCl (41)) y no crecen en pH 9.6. El peptidoglucano de su pared celular es Lis-D-Asp. Al menos una especie produce H₂S. Se encuentran en el pescado, en las heces y en el agua (12). Algunos como *V. lutrae* son productores de acetoina y de ácido a partir de glucosa (42).

El género *Vagococcus* fue descrito por Collins *et al.* en 1989 como un coco del grupo N de Lancefield, filogenéticamente distinto a los lactococos. La primera especie caracterizada fue *V. fluvialis* en 1974. Cinco especies más han sido asignadas al género *Vagococcus* desde entonces: *V. salmonarum*, *V. fesuss*, *V. lutrae*, *V. carniphilus*, y por último *V. elongatus* (43).

Todas las bacterias son Gram positivas y aerobias o anaerobias facultativas (Tabla 3.2.1).

Tabla 3.2.1. Resumen de características destacables de los microorganismos encontrados en queso Cotija.

Microorganismo (género/especie)		Características metabólicas destacables
<i>Bacillus</i>	<i>spp</i>	Esporulado. Actividad principalmente proteolítica. Aerobio o anaerobio facultativo
<i>Staphylococcus</i>	<i>spp</i>	Actividad proteolítica y lipolítica. Aerobio o anaerobio facultativo.
	<i>aureus</i>	Potencialmente patógena. Halotolerante.
<i>Enterococcus</i>	<i>spp</i>	Actividad proteolítica extracelular. Ácido láctica. Halotolerante. Anaerobia facultativa. Productora de enterocinas.
<i>Lactococcus</i>	<i>spp</i>	Ácido láctica. Productora de bacteriocinas.
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Ácido láctica. Probiótica. Produce bacteriocinas.
	<i>paracasei</i>	Ácido láctica. Probiótica. Productora de bacteriocinas.
<i>Marinilactibacillus</i>	<i>spp</i>	Halotolerante. Láctica marina.
<i>Vagococcus</i>	<i>spp</i>	Halotolerante. Produce acidez.

Los géneros que se han encontrado con mayor frecuencia han sido *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Enterococcus spp.*, todos ellos con actividades enzimáticas lipolítica y proteolítica importantes.

3.3. Técnicas moleculares en el estudio de poblaciones microbianas

Para entender la presencia y el crecimiento de los microorganismos en alimentos se reconoce en la actualidad la importancia de su estudio con un enfoque ecológico. Los conceptos ecológicos constituyen las bases tanto para el control de microorganismos indeseables como para el uso racional de los mismos en la producción de alimentos fermentados y su uso como probióticos (44).

La necesidad de cultivar y aislar a los microorganismos para su identificación por métodos tradicionales ha limitado la comprensión de la diversidad microbiana, puesto que más del 90% de los que existen en ambientes naturales no pueden ser cultivados (45), además de la imposibilidad de obtener cepas puras de ciertos microorganismos debido a que su desarrollo depende de las actividades metabólicas de otros o porque no se conocen sus condiciones de cultivo.

Una alternativa para la determinación de la estructura microbiana en alimentos es aislar microorganismos y tipificarlos; otra es utilizar métodos independientes de cultivo en los que se extraen ácidos nucleicos directamente del alimento para casi siempre someterlos a amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Figura 3.3.1.) (44).

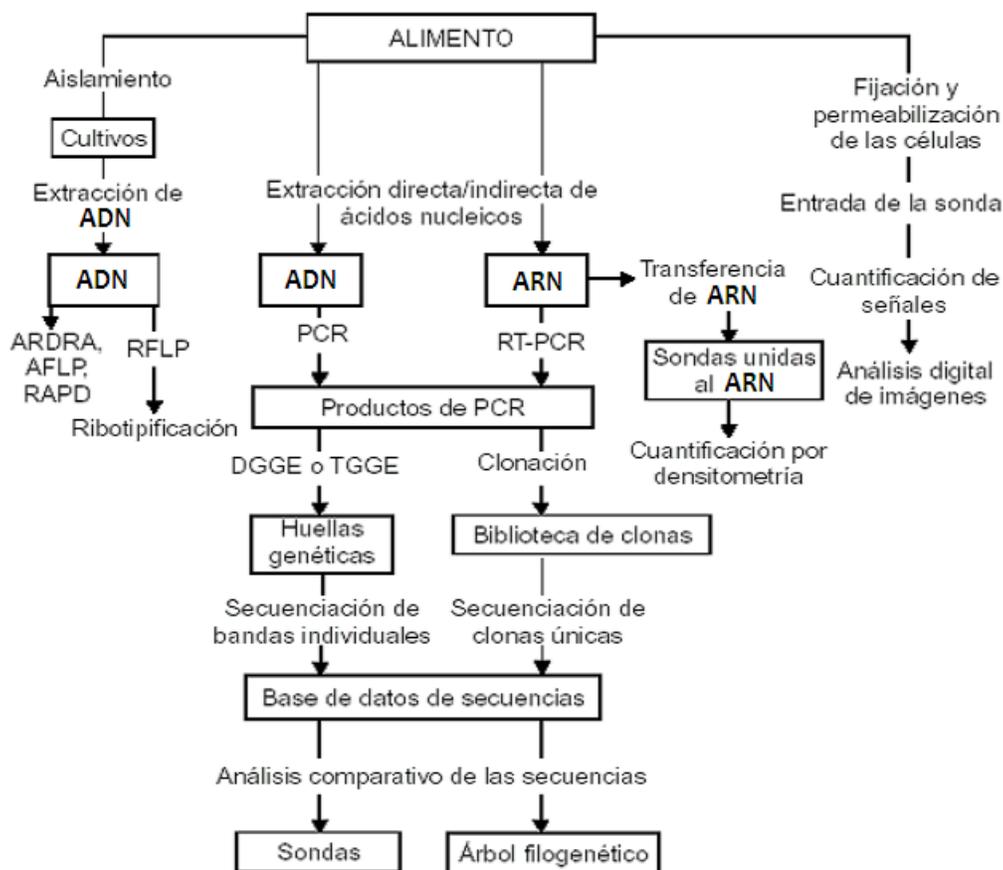


Fig. 3.3.1. Evaluación de comunidades microbianas en alimentos fermentados (44).

Las técnicas basadas en PCR ponen a disposición la detección rápida y sensible de microorganismos independientemente de que sean o no cultivables; de cualquier forma, estas técnicas proveen información limitada sobre el número y la disposición espacial de los mismos, sin tomar en cuenta los sesgos que implica la extracción del material genético directamente de la muestra, pues no es igual la lisis de todas las células; además, es posible que ocurra la amplificación preferencial de algunas secuencias sobre otras, la formación de productos quiméricos, problemas con impurezas en la muestra que merman en la eficiencia de la polimerasa, etc. (46).

Por estas razones surge la necesidad de desarrollar una técnica microscópica similar a la tinción de Gram e independiente de PCR. La técnica tendría que ser tan sensible como las ya bien establecidas técnicas de inmunofluorescencia, pero en lugar de marcar antígenos, debería basarse en ácidos nucleicos. El análisis comparativo de secuencias homólogas de ácidos nucleicos, más notablemente en moléculas de ARN ribosomal (ARNr) y los genes que lo codifican, ha resuelto el planteamiento anterior y se ha aprovechado la amplitud de la base de datos de secuencias existente. Desde su primer aplicación como marcadores filogenéticos en 1989 (47), las sondas de oligonucleótidos etiquetadas con fluorescencia dirigidas a ARNr, se han convertido en una herramienta común para la identificación directa e independiente de cultivo de células bacterianas individuales (48).

El ARNr es la molécula blanco principal en FISH por varias razones: se encuentra en todos los organismos vivos, es relativamente estable y se encuentra en un alto número de copias (usualmente del orden de varios cientos por célula en cada replicación en microorganismos metabólicamente activos), además de que incluye dominios variables y altamente conservados (49).

La molécula de ARNr

Existen varios tipos de ARN que difieren en tamaño, estructura y función específica. Todos ellos son sintetizados a partir de secuencias de ADN que sirven como molde.

El ARNr constituye alrededor del 80% del ARN celular total. Sus moléculas son monocatenarias y de gran longitud (varios miles de nucleótidos). Algunos de ellos presentan horquillas y bucles con secuencias internas complementarias. Se encuentran en el citoplasma, donde, en asociación con diferentes proteínas, forman parte estructural de los ribosomas.

El ribosoma es la maquinaria macromolecular que se encarga de la síntesis de proteínas y se compone de al menos tres moléculas de ARN y más de 50 diferentes proteínas, que conforman una estructura con masa molecular que rebasa los 2.5 megadaltones (MDa). Comparada con la velocidad de replicación del ADN que va de 200 a 1,000 nucleótidos por segundo, la traducción ocurre a razón de solo 2-20 aminoácidos por segundo (50).

La estructura del ribosoma está conformada por dos unidades compuestas de ARN y proteínas conocidas como subunidad grande y subunidad pequeña. La subunidad grande contiene el centro peptidiltransferasa, que es responsable de la formación del enlace peptídico, mientras

que la subunidad pequeña contiene el centro decodificador, en el que se carga el ARN de transferencia (ARNt) que contiene el anticodón del ARN mensajero (ARNm).

Por convención, las subunidades grande y pequeña son denominadas de acuerdo a la velocidad a la que sedimentan cuando son expuestas a una fuerza centrífuga. La unidad que se utiliza para medir la velocidad de sedimentación es el Svedberg (S; valores más altos del valor S, indica mayor velocidad de sedimentación y por lo tanto una molécula más grande), en honor al inventor de la ultracentrífuga, Theodor Svedberg.

En bacterias las subunidad grande tiene una velocidad de sedimentación de 50 unidades Svedberg, por lo que se denomina subunidad 50S, mientras que la subunidad pequeña es llamada 30S. El ribosoma procarionte intacto es referido como ribosoma 70S. Nótese que 70S es menos que la suma de 50S y 30S, la explicación a esta aparente discrepancia es que la velocidad de sedimentación está dada tanto por el tamaño como por la forma de la molécula y no es una medida exacta de la masa.

El ribosoma eucarionte es un poco más grande (Figura 3.3.2), se compone de las subunidades 60S y 40S, y juntos conforman al ribosoma 80S (50).

Las subunidades grande y pequeña están constituidas por uno o más ARNr, conocidos como ARNr y muchas proteínas ribosomales. Las unidades Svedberg también son utilizadas para distinguir entre ARNr. En bacterias, la subunidad 50S contiene un rRNA 5S y un rRNA 23S, mientras que la subunidad 30S contiene un solo rRNA 16S.

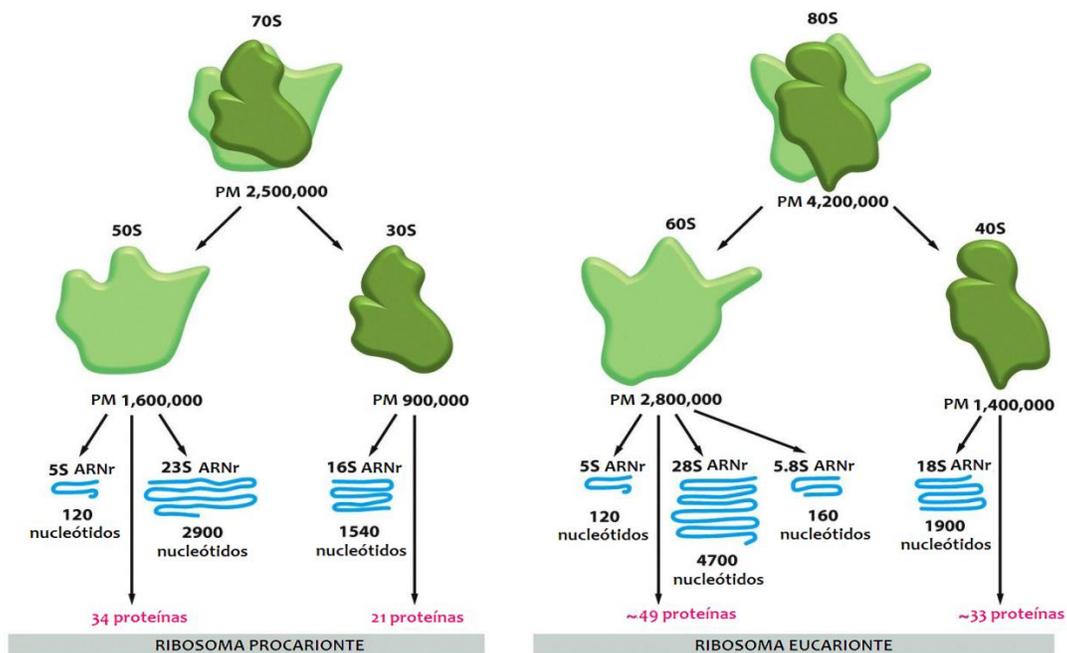


Fig. 3.3.2. Composición del ribosoma procarionte y eucarionte.

Aun cuando hay muchas más proteínas ribosomales que ARNr en cada subunidad, más de dos terceras partes de la masa del ribosoma procarionte es ARN. Esto debido a que las proteínas ribosomales son muy pequeñas (alrededor de 15 kDa en promedio). En contraste, los ARNr 16S

y 23S son grandes, y cada nucleótido tiene una masa molecular promedio de 330 Da, por lo que por sí mismo, sólo el ARNr 23S con sus 2,900 nucleótidos, tiene una masa molecular de casi 1,000 kDa.

El principal indicio de la importancia del ARN en la estructura y función del ribosoma es que la mayoría de las proteínas ribosomales se encuentran en la periferia del ribosoma y no en su interior. Los dominios funcionales del ribosoma (el centro peptidil transferasa y el centro de decodificación), están compuestos casi en su totalidad por ARNr. Porciones de algunas proteínas ribosomales que alcanzan el interior de las subunidades, parecen tener únicamente la función de estabilizar el ARNr que se encuentra fuertemente empaquetado, interactuando con las cargas negativas propias del enlace azúcar-fosfato de su estructura.

El ARNr, juega un papel primordial en la función de la subunidad pequeña del ribosoma. El asa anticodón del ARNt y los codones del ARNm, contactan el ARNr 16S, no las proteínas ribosomales de la subunidad pequeña. Además, este ARNr es de gran importancia en el inicio de la transcripción, ya que el ensamble del ribosoma en un ARNm ocurre en un principio en la subunidad pequeña y en procariontes esta asociación está mediada por la interacción entre las bases que conforman el sitio de unión al ribosoma (sitio RBS por sus siglas en inglés), que es una secuencia consenso en el ARNm, y el ARNr 16S. Cuando el sitio RBS se encuentra posicionado a una distancia ideal, la subunidad pequeña se ensambla en el ARNm de modo que el codón de inicio AUG coincide justo con el sitio P de entrada del primer ARNt en la subunidad grande del ribosoma cuando ésta se une al complejo. De esta forma inicia el proceso de síntesis de proteínas o traducción (50).

Técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

En la mayoría de los trabajos de hibridación *in situ*, las sondas se diseñan para marcar fragmentos del ARNr 16S (ver Anexo 5). Las bases de datos públicas contienen las secuencias de los genes ribosomales 16S de la mayoría de los microorganismos cultivables así como de numerosas secuencias obtenidas directamente del análisis del medio ambiente. Las sondas son diseñadas utilizando la información disponible en las bases de datos así como programas computacionales.

Un protocolo típico de FISH incluye cuatro pasos: la fijación, hibridación, lavados para remover la sonda no unida y la detección de células marcadas por microscopía (48). En algunos casos, por ejemplo para bacterias Gram positivas, se lleva a cabo un tratamiento adicional con lisozima, lisostafina o una mezcla de enzimas para abrir la capa de peptidoglucano antes de llevar a cabo la hibridación.

La hibridación debe ser llevada a cabo en condiciones astringentes que propicien el alineamiento de la sonda con la secuencia complementaria dentro de la célula. Para este paso crucial, se realiza un precalentamiento del buffer de hibridación que contiene la sonda marcada. La hibridación tiene lugar en una cámara oscura con humedad controlada usualmente a temperaturas de entre 37 y 50°C, y puede tomar entre 30 min y varias horas (51). Después de

los lavados pertinentes, los portaobjetos pueden ser secados y montados en agentes antidecolorantes que están disponibles comercialmente para evitar la pérdida de fluorescencia.

En la selección de las sondas para la técnica de FISH, se debe considerar especificidad, sensibilidad y fácil penetración a la célula (52). Éstas generalmente tienen de 15-30 nucleótidos de longitud, son diseñadas para hibridar contra regiones variables del gen ribosomal 16S y generadas en un sintetizador automático. Las sondas cortas generalmente presentan fácil acceso a su secuencia blanco, pero pueden acarrear problemas de baja especificidad (48).

Existen diferentes formas de marcar o etiquetar, el marcaje directo en la sonda es el más utilizado y el más rápido, barato y fácil, pues no requiere de muchos pasos para llevar a cabo la detección después de la hibridación. Una o más moléculas fluorescentes son unidas directamente al oligonucleótido mediante síntesis química a través de un enlace amino en el extremo 5' de la sonda, o enzimáticamente utilizando la transferasa terminal para colocar el fluoróforo en el extremo 3' (52). Un incremento en la señal de fluorescencia se ha reportado cuando el oligonucleótido se marca en ambos extremos, una molécula fluorescente en el extremo 3' y cuatro moléculas en el extremo 5', utilizando espaciadores apropiados para evitar apagamiento (53). En algunos casos la identificación indirecta es útil, la sensibilidad de la técnica puede ser incrementada cuando se utilizan moléculas reporteras unidas a la sonda tales como la digoxigenina (DIG), que es luego detectable por un anticuerpo fluorescente. Las sondas pueden almacenarse a -20°C en oscuridad durante varios meses. Distintos tipos de marcaje se ilustran en la Figura 3.3.3. (52).

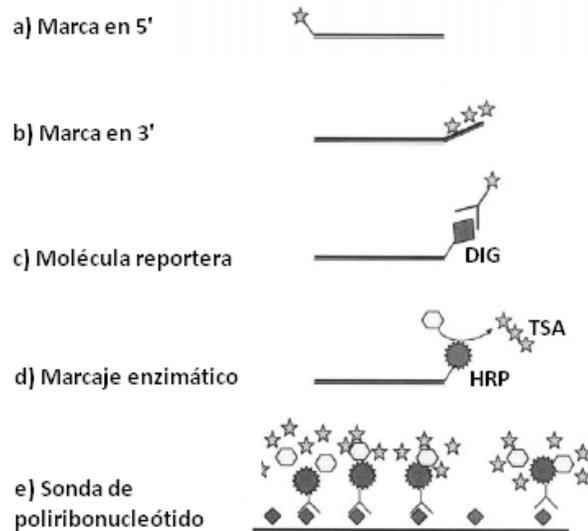


Fig. 3.3.3. Marcaje de sondas directo en a) y b), e indirecto de c) a e) utilizando digoxigenina (DIG), peroxidasa de rábano (HRP) y amplificación de señal de tiramida (TSA).

Los fluoróforos más comúnmente utilizados para marcar en 5' incluyen a la fluorescina, tetrametilrodamina, rojo Texas y carbocianinas como Cy3 y Cy5. Fluorocromos con distinta longitud de onda de máxima excitación y emisión pueden ser utilizados para la detección de dos o más microorganismos simultáneamente. Para la observación microscópica simultánea de FISH

multicolor, se pueden utilizar filtros que permitan el paso de distintas longitudes de onda a la vez. En la combinación de los fluorocromos deberá tomarse en cuenta la forma de los picos de emisión para prevenir espectros sobrelapados entre sondas y así eliminar problemas de interferencia entre ellas (52).

Las sondas pueden diseñarse para discernir a nivel taxonómico, entre bacterias y arqueas, o a niveles género específicas o especie específicas en función de la región del ARNr a la que vaya dirigida. Si el objetivo es identificar un grupo taxonómico no muy estrecho, las sondas pueden ser adaptadas para orientarse hacia sitios menos variables de la molécula de ARNr.

Las sondas deben probarse en distintas bases de datos disponibles en línea así como contra cepas puras para corroborar su especificidad (46).

El proceso de fluorescencia (54)

La fluorescencia es el resultado de un proceso que conlleva tres estados en ciertas moléculas (generalmente hidrocarburos poliaromáticos o heterociclos). Dicho proceso se ilustra por el diagrama de estado electrónico de Jablonski que se presenta en la Figura 3.3.4.

Estado 1: Excitación. Un fotón de energía $h\nu_{EX}$ es donado por una fuente externa como por ejemplo una lámpara incandescente o láser y absorbido por el fluoróforo creando un estado electrónico excitado singlete (S_1'). Este proceso distingue la fluorescencia de la quimiluminiscencia en el sentido de que el estado excitado es mediado por una reacción química.

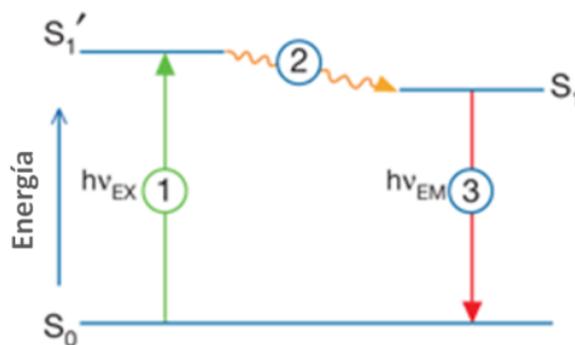


Fig. 3.3.4. Diagrama de Jablonski que ilustra el proceso por el cual el fluoróforo alcanza un estado electrónico excitado singlete por absorción óptica y la subsecuente emisión de fluorescencia. 1) Excitación, 2) Estado excitado, 3) Emisión de fluorescencia (54).

Estado 2: Tiempo de vida del estado excitado. El estado excitado existe por un tiempo finito que normalmente va de 1-10 nanosegundos. Durante este tiempo el fluoróforo sufre cambios conformacionales y es objeto de múltiples interacciones con su ambiente molecular. Este proceso tiene dos consecuencias importantes: primero, la energía de S_1' es parcialmente disipada, llevando a un estado relajado (S_1) del cual se origina la fluorescencia; segundo, no todas las moléculas inicialmente excitadas por la absorción en el estado 1 regresan al estado basal (S_0) por emisión de fluorescencia. Otros fenómenos como el apagamiento por colisión, la

transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y el entrecruzamiento en el sistema pueden disminuir la población de moléculas en estado S_1 . El rendimiento de la fluorescencia, que es la relación del número de fotones fluorescentes emitidos (estado 3) entre el número de fotones absorbidos (estado 1), es una medida del grado relativo en que estos procesos ocurren.

Estado 3: Emisión de la fluorescencia. Un fotón con energía $h\nu_{EM}$ es emitido, regresando al fluoróforo a su estado basal S_0 . Como existe disipación de energía durante el tiempo de vida del estado excitado, la energía de este fotón es menor y por ende de longitud de onda más larga que el fotón de excitación $h\nu_{EX}$. La diferencia de energía o de longitud de onda se denomina desplazamiento de Stokes. Este parámetro es fundamental para la sensibilidad de las técnicas basadas en fluorescencia.

El proceso completo de fluorescencia es cíclico y a menos que el fluoróforo sea irreversiblemente destruido en el estado excitado (fenómeno conocido como fotoblanqueamiento), el mismo fluoróforo puede ser excitado repetidamente y detectado. El hecho de que una sola molécula de fluoróforo pueda generar cientos de fotones detectables es fundamental para la alta sensibilidad de las técnicas de detección de la fluorescencia.

Espectros de excitación y emisión

Para moléculas poliatómicas en solución, la transición electrónica representada por $h\nu_{EX}$ y $h\nu_{EM}$ en la Figura 2.3.4, se sustituye por un más amplio espectro de energía llamado espectro de excitación y emisión de fluorescencia. Los anchos de banda de estos espectros son parámetros de particular importancia para la detección simultánea de dos o más fluoróforos. El espectro de excitación de un solo fluoróforo en solución diluida es usualmente idéntico al espectro de absorción. Este último puede ser utilizado como un sustituto del espectro de excitación.

La intensidad de la emisión es proporcional a la amplitud del espectro de excitación a la longitud de onda de excitación (Figura 3.3.5).

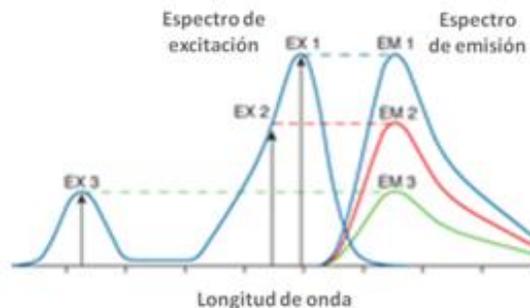


Fig. 3.3.5. Excitación de un fluoróforo a tres diferentes longitudes de onda (EX 1, EX 2, EX 3) no cambia el perfil de emisión pero produce variaciones en la intensidad de la fluorescencia de emisión (EM1, EM2, EM3) (54).

Las muestras biológicas marcadas con fluorescencia, típicamente contienen más de una especie capaz de emitir una señal detectable (como fluoróforos intrínsecos o autofluorescentes),

haciendo más complejo el aislamiento de las mismas. Lo anterior se complica aún más cuando se utilizan 2 o más fluoróforos a la vez (Figura 3.3.6).

Las señales de absorción causadas por autofluorescencia de células, tejidos y fluidos biológicos se minimizan con el uso de sondas que se excitan a longitudes de onda de más de 500 nm. Más aún, a longitudes de onda mayores, la dispersión de luz por los medios densos como los tejidos, es muy reducida, lo que resulta en una mejor penetración de la luz de excitación (55).

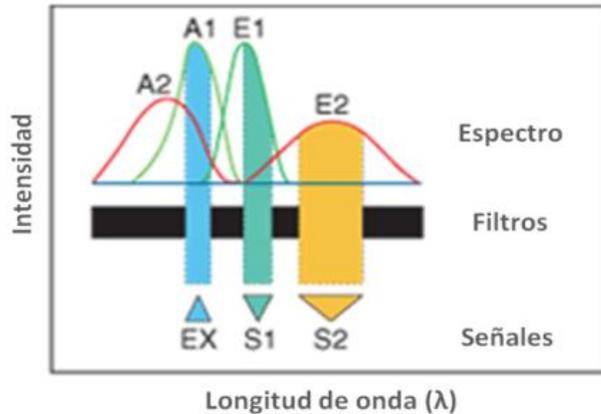


Fig. 3.3.6. Detección de fluorescencia de una mezcla de especies. La excitación (EX) en traslape con las bandas de absorción A1 y A2 produce dos especies fluorescentes con los espectros E1 y E2. Los filtros ópticos aíslan las señales de emisión cuantificables S1 y S2 (54).

La experimentación con marcaje multicolor implica la introducción deliberada de dos o más sondas simultáneamente para monitorear distintas funciones biológicas. Esta técnica es socorrida principalmente en citometría de flujo, secuenciación de ADN, hibridación *in situ* y microscopía de fluorescencia. El aislamiento de la señal y el análisis de datos se facilitan maximizando la separación de los espectros de las múltiples emisiones (E1 y E2 en la figura anterior). Consecuentemente los fluoróforos con espectros de emisión en los que las bandas son estrechas, son muy útiles en la aplicación de multicolor. Una combinación ideal de fluoróforos será aquella en la que ambas sondas compartan una fuerte absorción a la misma longitud de onda, pero que presenten espectros de emisión bien separados (56).

Otras características importantes de los fluoróforos son el coeficiente de extinción molar y el rendimiento cuántico. El coeficiente de extinción molar es una medida de la eficiencia con la cual un fluoróforo absorbe la luz de una fuente de excitación y la cantidad de luz fluorescente que será capaz de generar: un alto coeficiente resultará en fluoróforos más brillantes.

La intensidad de fluorescencia de un fluoróforo está directamente relacionada con su rendimiento cuántico, el cual es la fracción del número de fotones absorbidos que son convertidos en el número de fotones emitidos. Rendimientos cuánticos altos resultan en altas intensidades de fluorescencia (54).

Fenómenos de apagamiento (57)

Apagamiento por FRET

La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o transferencia de energía tipo Förster, es un mecanismo mediante el cual la energía es transferida entre dos moléculas. Durante este proceso, un fotón proveniente de un fluoróforo energéticamente excitado (el donador) lleva a un electrón en otra molécula (el aceptor) a niveles vibracionales superiores del estado excitado singulete. Como resultado el nivel energético del fluoróforo donador regresa al estado basal sin haber emitido fluorescencia. Este mecanismo depende de la orientación del dipolo de ambas moléculas y está limitado por la distancia entre ellas. Típicamente, la distancia efectiva entre el donador y el aceptor se encuentra en el intervalo de 10-100 Å, que corresponde a la distancia que hay aproximadamente entre 3 y 30 nucleótidos localizados en una doble hélice de DNA. Otro requerimiento es que el espectro de emisión de la molécula donadora se sobrelape con el espectro de absorción de la molécula receptora.

El aceptor puede ser otro fluoróforo o incluso una molécula no fluorescente. Si el aceptor es un fluoróforo, la energía de transferida puede emitirse como fluorescencia a la longitud de onda de emisión característica de esa molécula. En caso de que el aceptor sea una molécula no fluorescente, la energía absorbida se perderá en forma de calor y no se observara emisión de fluorescencia de ese complejo.

Apagamiento por contacto

El apagamiento, disminución o pérdida de la señal de fluorescencia puede ocurrir como resultado de la formación de un complejo no fluorescente ya sea entre un fluoróforo y otro o con una molécula que no fluoresca. Este mecanismo es conocido como apagamiento por contacto, apagamiento estático o formación de complejo de estado basal.

En el apagamiento por contacto, dos moléculas interactúan por transferencia de electrones y protones mediante la formación de puentes de hidrógeno. En medio acuoso, las fuerzas electrostática, hidrofóbicas y estéricas controlan la formación de dichos puentes. Cuando estos complejos absorben energía en forma de luz, el estado excitado inmediatamente regresa al estado basal sin emitir fotones.

Una características del apagamiento por contacto es el cambio en el espectro de absorción de las dos moléculas cuando se encuentran formando parte del complejo, en comparación con el mecanismo FRET, donde los espectros de absorción de las moléculas no cambia.

Apagamiento por colisión

También conocido como apagamiento dinámico, ocurre cuando un fluoróforo que ha alcanzado el estado excitado es desactivado al contacto con otra molécula en la misma solución. Al contacto, el fluoróforo regresa al estado basal si la emisión de fotones. El grado de apagamiento dependerá de la naturaleza del fluoróforo, su estructura, y la manera en la que interactúe con

la otra molécula. Ejemplos de moléculas que podrían actuar como apagadores colisionales son el oxígeno, halógenos y aminas.

Detección de fluorescencia

Cualquier sistema de detección de fluorescencia, independientemente de la aplicación, debe contar con cuatro elementos esenciales: 1) una fuente de luz de excitación, 2) el fluoróforo, 3) filtros de longitud de onda para aislar los fotones de emisión de los de excitación y 4) un detector capaz de registrar los fotones de emisión y producir un dato almacenable, usualmente como una señal eléctrica (54).

El sistema de detección más usado en la técnica de FISH es el microscopio confocal debido a la versatilidad de longitud de onda de excitación cuya fuente de luz es capaz de emitir, además de que permite la obtención de imágenes en distintos planos focales.

Microscopio confocal (58)

El principio del microscopio confocal de exploración laser de epi-fluorescencia se esquematiza en la Figura 2.3.7. La luz emitida por el sistema laser (fuente de excitación) con una longitud de onda adecuada, pasa a través de la apertura del colimador que está situada en plano conjugado (confocal). El láser es reflejado por el espejo dicromático y escinde sobre la preparación en un plano focal definido. La fluorescencia secundaria emitida por puntos definidos del espécimen (en el mismo plano focal), pasa de regreso a través del espejo dicromático y es enfocada como un punto confocal hacia la apertura del colimador que se encuentra frente al detector.

La cantidad significativa de fluorescencia emitida que se proyecta sobre y debajo del plano del objetivo focal no es confocal con el colimador (los denominados rayos de luz fuera de foco en la Figura 3.3.7). Como solo una fracción pequeña de la fluorescencia emitida fuera de foco pasa a través de la apertura del colimador, la mayoría de esta luz ajena no es detectada por el fotomultiplicador y no contribuye a la imagen resultante.

Reorientando el objetivo en un microscopio confocal, se modifican los puntos de excitación y emisión sobre el espécimen a un nuevo plano que se vuelve confocal con respecto a la apertura del colimador de la fuente de luz y del detector, lo que permite la observación de la misma preparación en diferentes planos.

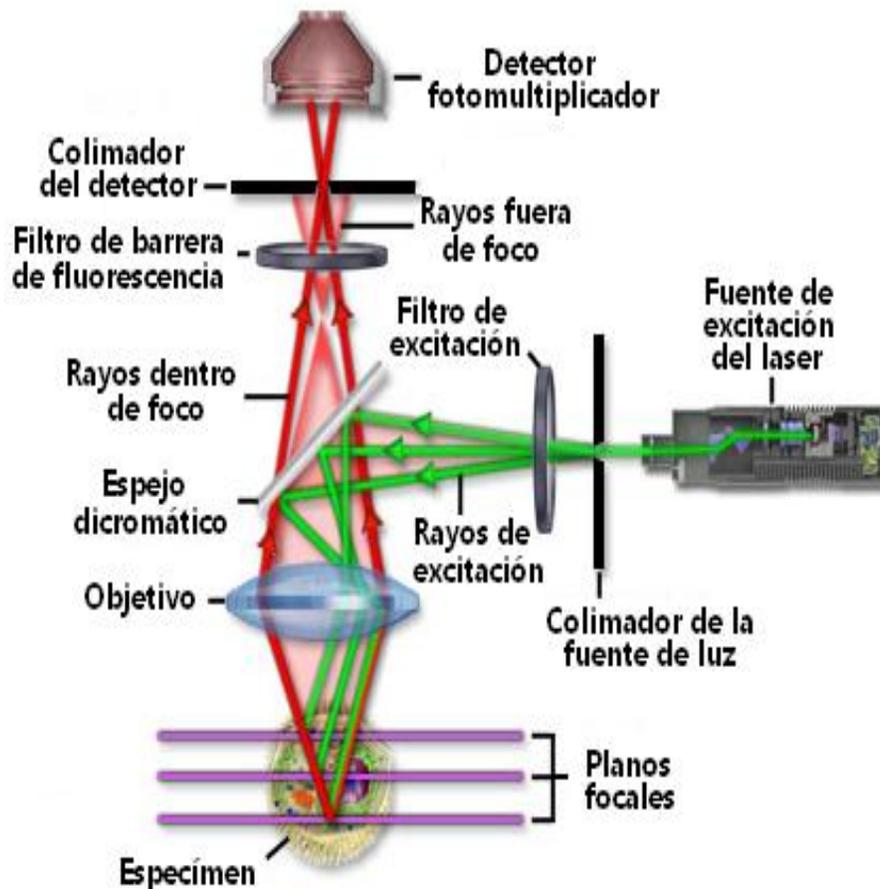


Fig. 3.3.7. Esquema de la ruta óptica y componentes principales de un microscopio confocal con escáner láser.

En un microscopio tradicional de epifluorescencia, la preparación completa es objeto de una intensa iluminación por una lámpara de descarga de arco de mercurio o xenón, lo que resulta en la generación de una imagen a partir de la emisión del espécimen que puede ser visualizada directamente con los oculares o proyectada en una superficie de detección de arreglo electrónico o sobre una película plana tradicional. En contraste con este concepto, la generación de la imagen en el microscopio confocal es fundamentalmente distinta.

El fotomultiplicador

En cualquier sistema de microscopía de fluorescencia, la recolección y medida de la emisión secundaria por el objetivo puede ir acompañada de muchas clases de detectores fotosensibles, incluyendo fotomultiplicadores, fotodiodos, etc. En microscopía confocal, la fluorescencia emitida atraviesa directamente la abertura del colimador colocado cerca del plano de la imagen para excluir la luz de estructuras fluorescentes localizadas lejos del plano focal del objetivo, reduciendo la cantidad de luz disponible para la formación de la imagen.

Los fotomultiplicadores o TFM (Figura 3.3.8) son el detector de elección en la mayoría de los microscopios confocales comerciales. Éstos contienen una superficie fotosensible que captura los

fotones incidentes y produce una corriente de fotoelectrones que genera una carga eléctrica amplificada. Estos detectores contienen un elemento crítico llamado fotocátodo, que es capaz de emitir electrones a través de la señal fotoeléctrica (la energía de un electrón absorbido es transferida a un electrón), cuando se expone a un flujo de fotones.

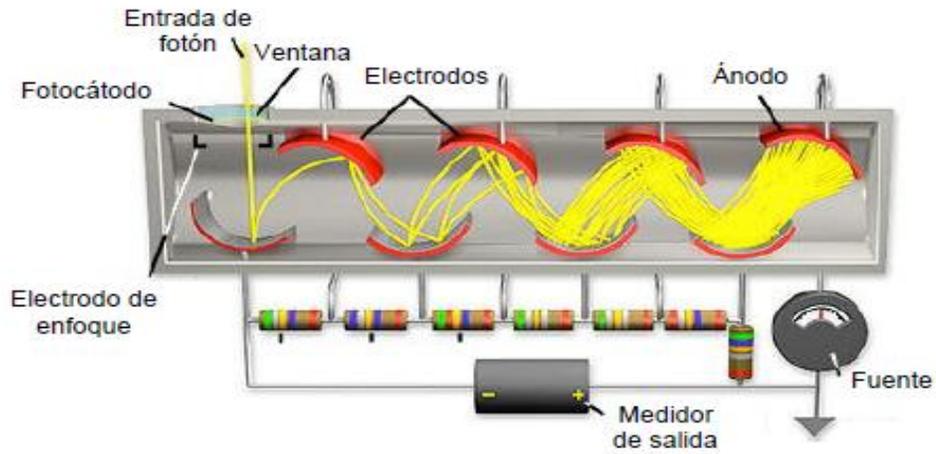


Fig. 3.3.8. Esquema de un fotomultiplicador.

4. Justificación

Este trabajo es una primera aproximación al estudio de los principales géneros bacterianos identificados con anterioridad en queso Cotija, en función de la distribución espacial en una pieza en la que se generan gradientes de composición y por lo tanto, la formación de microambientes.

Al tratarse de una pieza que ha sido sometida a cierto tiempo de maduración (3 meses), el resultado será una "fotografía" de la comunidad bacteriana que ocupa dicho espacio hasta ese momento.

Los estratos fisicoquímicos que se logren definir y la caracterización bacteriana de cada uno de ellos permitirán analizar la relación entre los microorganismos colonizadores y el microambiente que habitan. Para esto fue necesario acudir al montaje de metodologías de tipo molecular debido a la imposibilidad de cultivar la microbiota bacteriana completa en condiciones de laboratorio.

El análisis de la microbiota bacteriana se enfocó en la caracterización a nivel de género de tres de los microorganismos encontrados con mayor frecuencia en queso Cotija y que poseen actividades metabólicas de proteólisis y lipólisis importantes.

Por último la importancia de generar información interesante con respecto a un producto nacional de manufactura artesanal, permite ampliar la visión sobre la diversidad y riqueza de los alimentos elaborados en nuestro país que gozan de excelentes características sensoriales y de calidad, mismas que han sido reconocidas en certámenes de talla internacional.

5. Hipótesis

Si los gradientes fisicoquímicos que se establezcan en una pieza de queso Cotija son lo suficientemente claros como para generar microambientes distintos en cada zona, entonces se verá afectada la distribución de tres de los géneros bacterianos encontrados con mayor frecuencia, lo que podría verse reflejado en los perfiles de ácidos grasos libres y de proteínas en cada zona producto de sus actividades proteolítica y lipolítica.

6. Objetivos:

Objetivo general:

Establecer si existe relación entre las características fisicoquímicas de una pieza de queso Cotija con los microorganismos presentes en ésta en función de la distribución espacial.

Objetivos particulares:

Identificar la formación de gradientes fisicoquímicos de pH, actividad acuosa, potencial redox y acidez en la pieza.

Comparar los perfiles de proteínas y lípidos como herramientas para establecer diferencias sobre la hidrólisis de estos componentes en cada estrato.

Caracterizar la distribución y abundancia espacial de la microbiota bacteriana compuesta por los géneros *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. y *Bacillus* spp. en la pieza de queso por la técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) optimizada para este sistema.

7. Estrategia experimental

La fase experimental de este trabajo consistió básicamente en dos grandes bloques: el análisis fisicoquímico y el microbiológico. Del segundo bloque se omiten varios experimentos que fueron clave en el montaje de la técnica de FISH pero que se mencionan en el texto (Figura 7.1.).



Fig. 7.1. Esquema general de experimentación

El queso objeto de este estudio es una pieza completa de forma cilíndrica de aproximadamente 26 cm de diámetro por 16.5 cm de alto que se desmorona al corte.

El producto se considera de tipo añejo puesto que fue sometido a un proceso de maduración de 3 meses. Fue adquirido en la feria del queso de Cotija celebrada en 2010 y trasladado al laboratorio del Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM, donde se mantuvo en congelación a -70°C hasta su análisis.

La pieza fue dividida en 4 zonas o estratos de 3 cm de espesor cada una comenzando por el centro y se tomó a la corteza como zona 5, misma que fue cortada con un espesor de 0.5 cm aproximadamente tal y como lo muestra la Figura 7.2.

Cada uno de los cortes fue almacenado en bolsas de sellado hermético y colocado en refrigeración hasta el momento de su análisis fisicoquímico.

En el primer bloque, la caracterización fisicoquímica incluyó la determinación de actividad acuosa, cloruros, pH, acidez, calcio y potencial redox, así como la evaluación de sustratos y productos de interés metabólico, donde se incluyó la determinación del perfil electroforético de proteínas y el perfil de ácidos grasos totales y libres.

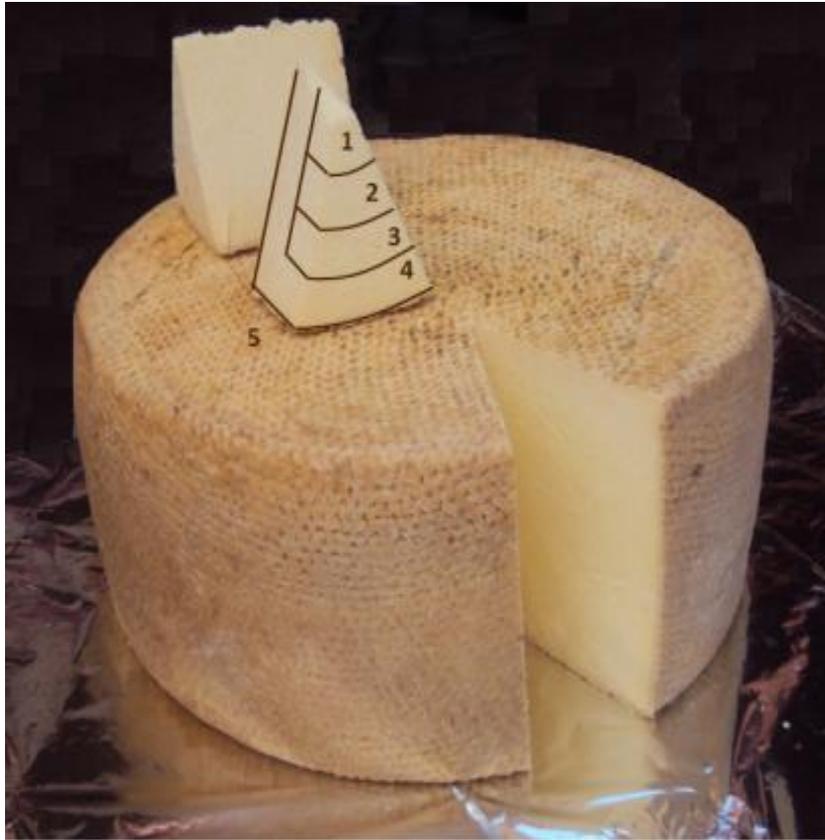


Fig. 7.2. Estratificación de la muestra en 5 zonas distintas.

En cuanto al análisis microbiológico, se llevó a cabo la determinación de las cinéticas de crecimiento, pruebas de permeabilización y optimización de las condiciones de hibridación en cepas puras antes de trabajar sobre el paquete celular extraído de queso para proceder con la cuenta de señales positivas.

Se realizaron pruebas de especificidad con las sondas correspondientes y la sonda universal como controles positivos y pruebas cruzadas con el resto de las sondas en todos los microorganismos como controles negativos.

Se cortó el queso en tres regiones distintas correspondientes a cada zona y se homogeneizaron juntas para extraer el paquete celular, sobre el cual se realizaron tres hibridaciones independientes con cada sonda específica y la universal.

8. Metodologías

8.1. Determinación de actividad acuosa (a_w)

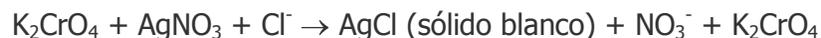
Se homogeneizó muestra suficiente (5 g) para cubrir la superficie de la placa del equipo aWQuick (Rototronic Instrument Corp). Cuando la lectura fue estable e indicada por el equipo como una doble alarma, se registró directamente el valor de actividad acuosa.

8.2 Determinación de cloruros (59)

Se pesaron 10 g de muestra en balanza analítica y se agregaron 40 mL de agua a 50°C en un matraz Erlenmeyer. Este fue incubado durante 30 minutos con agitación a 200 rpm para extraer el material soluble.

Se decantó y el sólido fue filtrado con gasa y lavado con agua hasta juntar un volumen de aprox. 100 mL

El pH del líquido obtenido fue ajustado a 7 y aforado a 100 mL. De allí se tomó una alícuota de 20 mL a la que se adicionó 1 mL de solución al 10% p/v de K_2CrO_4 . La mezcla se tituló con $AgNO_3$ 0.1 N hasta observar una coloración rojo ladrillo estable por 20 segundos. Al mismo tiempo se tituló blanco de agua pH 7.



$$\%NaCl = \frac{(mL AgNO_3 \text{ mtra} - mL AgNO_3 \text{ blco}) \times N AgNO_3 \times 5.85}{g \text{ mtra} \times \text{alícuota (mL)}} \times \frac{\text{Aforo (mL)}}{\text{Aforo (mL)}}$$

8.3 Determinación de pH (60)

Se pesaron 9 g de muestra en balanza analítica y se colocaron en matraz Erlenmeyer de 250 mL, al que se agregaron 100 mL de agua destilada pH 7 a temperatura ambiente y se sometió a agitación a 200 rpm durante 15 min a 30°C.

El contenido se filtró con gasa hasta obtener una disolución sin grumos ni glóbulos grasos y se midió directamente el pH con electrodo de Ag/calomel.

8.4 Determinación de acidez (61)

A partir del filtrado anterior, se tomó una alícuota de 25 mL con pipeta volumétrica y se transfirió a matraz Erlenmeyer de 250 mL, al que se adicionaron 0.5 mL de fenolftaleína al 1% p/v en solución alcohólica.

Se tituló con NaOH 0.1 N con agitación continua hasta que se observó el vire a color rosa claro que se mantuvo por 30 segundos.

$$\% \text{ Ácido láctico} = \frac{(\text{mL NaOH} \times \text{N NaOH} \times 0.09 \text{ meq}) \times 100}{\text{g muestra}}$$

8.5 Determinación de contenido de calcio (62)

Se pesaron de 2-3 g de queso en crisol de porcelana y se obtuvieron las cenizas en mufla a 550°C. Una vez frías, se adicionó de 1-2 mL de agua destilada y 0.5 mL de H₂SO₄ concentrado.

La dispersión se trasladó a matraz Erlenmeyer de 250 mL y se enjuagó el crisol con agua destilada hasta que se obtuvo un volumen de aproximadamente 50 mL.

Se adicionaron de 15-20 mL de EDTA 0.1 M valorada más 8 mL de NaOH 4 M, más 100 mg de indicador α -hidroxinaftol (Sigma). En los casos en los que no se observó coloración azul, se adicionó más EDTA medido con bureta.

Enseguida se adicionaron entre 15-20 mL de solución de CaCl₂ 0.02 M hasta observar el vire de la disolución a rojo brillante. En ese momento, la disolución se tituló con EDTA hasta observar coloración azul que permanecía por 60 segundos.

El contenido de calcio fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{Ca} = \frac{[(\text{mL totales de EDTA})(\text{M EDTA}) - (\text{mL CaCl}_2)(\text{M CaCl}_2)] \times 40.08 \times 100}{\text{muestra pesada (mg)}}$$

8.6. Determinación de potencial redox (Microelectrodos diseñados por el Dr. José de Jesús García Valdés)

En la Figura 8.1 se muestra un esquema de los electrodos de referencia (electrodo de plata) y de lectura (electrodo de platino).

El electrodo de referencia se construyó a partir de un alambre de plata que se puso en contacto con una solución de KCl 3 M, que hace las veces de puente salino entre el alambre y la membrana de vidrio colocada en la punta del sistema. Esta membrana entró en contacto directo con el queso.

El electrodo de platino se construyó a partir de un alambre de este material protegido con acero inoxidable y una capa de teflón entre ambos metales. Por la parte inferior del tubo de acero sobresalieron aprox. 2 cm de alambre que entraron en contacto con la muestra.

El sistema completo fue probado antes de intentar hacer mediciones en la muestra mediante titulaciones redox de permanganato/oxalato para determinar la obtención de valores reproducibles y que funcionara correctamente (Anexo 1).

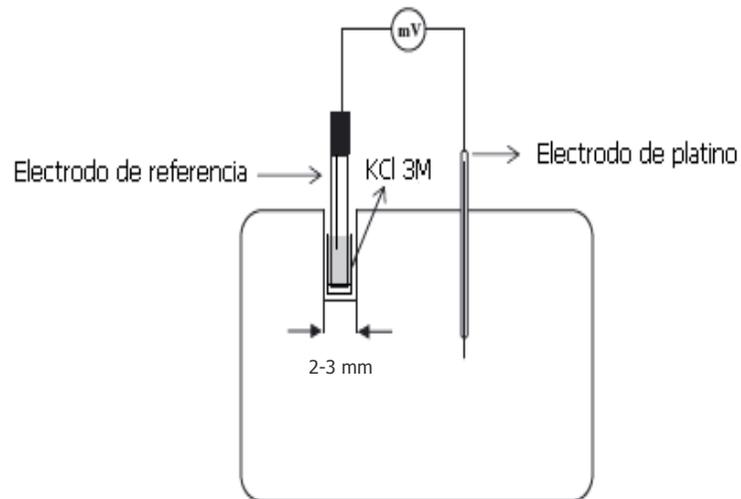


Fig. 8.1. Esquema del sistema de medición del potencial redox utilizando microelectrodos acoplados a un potenciómetro (11).

Para realizar las lecturas directamente en la pieza, ésta se cubrió de plástico auto-adherente para evitar que al agrietarse se incorporara aire al sistema. Se insertó una varilla de acero a una profundidad de 7 cm desde la cara plana del queso para abrir camino sin dañar los electrodos y garantizar que las lecturas fueran tomadas lo más cercanas a la parte media de la pieza. A continuación el electrodo fue insertado en el mismo hueco permitiendo que la punta del dispositivo abriera 1 cm más de camino para así minimizar la entrada de aire al momento de la lectura.

El sistema tardó alrededor de 15 a 20 segundos en estabilizar las lecturas. El potenciómetro acoplado a los electrodos fue el Beckman phi34 con número de serie 247434.

Las lecturas se llevaron a cabo por quintuplicado en cada una de las zonas. Se omitieron las lecturas de la corteza debido a que el potenciómetro no logró estabilizarse.

8.7. Perfil de proteínas (63)

Extracción de proteína soluble y electroforesis

Se homogeneizaron 5 g de queso con 25 mL de buffer de fosfatos pH 7 durante 5 min utilizando Ultraturax a 8,000 rpm.

Una vez terminada la homogeneización, el pH se ajustó a 4.4 con HCl con la finalidad de precipitar las caseínas. La suspensión se filtró y el sobrenadante se recuperó para determinar la concentración de proteína por el método de Lowry (curva de calibración en Anexo 2) después de reajustar el pH a 7. Se ajustó la concentración a 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, lo que permitió cargar 120 μg de proteína en cada pozo y se realizó electroforesis SDS-PAGE T=12.5% de acuerdo al manual de BioRad.

Los geles se corrieron a 100 V (fuente de poder Power/Pac Basic 300 de BioRad) hasta que el frente de corrida salió del gel. En cada uno se cargó un pozo con 5 μ L de marcador Fermentas #SM0431 conteniendo las proteínas que se enumeran en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1. Péptidos contenidos en mercador de peso molecular Fermentas.

Peso molecular (kDa)	Proteína	Fuente
116.0	β -galactosidasa	<i>E. coli</i>
66.2	Albúmina sérica bovina	Plasma bovino
45.0	Ovalbúmina	Huevo blanco de gallina
35.0	Lactato deshidrogenasa	Músculo porcino
25.0	REasa Bsp 98I	<i>E. coli</i>
18.4	β -lactoglobulina	Leche bovina
14.4	Lisozima	Huevo blanco de gallina

Los geles se escanearon en un equipo HP Sacanjet G4050 y fueron analizados con el software Quantity One 4.2.1 de BioRad.

Extracción de caseínas y electroforesis

Se homogenizaron 0.6 g de queso en 12.5 mL de urea 8M (pH 8) y la mezcla se incubó a 37°C durante 2h.

A continuación se centrifugó a 10,000 rpm (16,770 G) durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se filtró y luego se dializó durante 24 h a 5°C contra una solución de buffer de fosfatos pH 7 con una membrana de 1 kDa que permitió la salida de la urea.

Al extracto se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry (curva de calibración en Anexo 2).

Se ajustó la concentración de proteína igual que en el caso anterior y se realizó electroforesis en las mismas condiciones.

8.8. Perfil de ácidos grasos

Ácidos grasos totales (64)

Los ácidos grasos se extrajeron con una mezcla de cloroformo-etanol (1:1) y se evaporó el solvente a sequedad en baño maría a 60°C.

A la muestra reconstituida se adicionó ácido valérico como estándar interno y 2 mL de NaOH en metanol al 2% p/v, se sometió a ebullición en baño maría por 10 min y una vez frío a temperatura ambiente, se adicionó 1 mL de BF₃ en metanol al 14% v/v.

Se colocó nuevamente a ebullición por 2 min y se adicionaron 5 mL de heptano, para continuar en ebullición 2 minutos más. Una vez frío a temperatura ambiente, se colocaron 3 mL de solución saturada de NaCl y se sometió a centrifugación. Se extrajo la fase orgánica y se lavó con heptano.

Se filtró en papel con Na₂SO₄ y se evaporó el filtrado a sequedad. Se reconstituyó en 1 mL de hexano y se inyectó 1 µL del extracto en un cromatógrafo de gases Varian CP-3380, con inyector automático con detector de flama y columna capilar marca Agilent modelo HP-INNOWax, compuesta 100 de película de polietilenglicol de 0.25 µm, una longitud de 30 m y diámetro interno de 250 µm. Se utilizó N₂ como gas acarreador. La temperatura de inyección fue de 220°C, y la del detector de 275°C. El programa de temperatura de columna inició en 150°C que se mantuvo durante 1 min. La primera rampa fue un aumento de 15°C/minuto hasta alcanzar 225°C, temperatura a la que se mantuvo durante 5 minutos. Posteriormente, en la segunda rampa, la temperatura aumentó 5°C/min hasta alcanzar 230°C, manteniéndose así durante 17 minutos. El tiempo total del análisis fue de 29 minutos.

Se utilizó el software Instrument 1 Online 6890N para llevar a cabo la recolección de datos. La mezcla de estándares utilizada fue Supelco FAME mix C6-C22, que contiene una mezcla de los ácidos grasos de la Tabla 8.2.

Tabla 8.2. Ácidos grasos metilados contenidos en la mezcla de estándar.

Ácido graso metilado	% (p/p)	Ácido graso metilado	% (p/p)
metil octanoato (C8:0)	1.9	metil estearato (C18:0)	6.5
metil decanoato (C10:0)	3.2	metil cis-9-oleato (C18:1)	19.5
metil laurato (C12:0)	6.4	metil trans-9-elaidato (C18:1)	2.7
metil tridecanoato (C13:0)	3.2	metil linoleato (C18:2)	13
metil miristato (C14:0)	3.2	metil linolenato (C18:3)	6.4
metil miristoleato (C14:1)	1.9	metil araquidato (C20:0)	1.9
metil pentadecanoato (C15:0)	1.9	metil eicosenoato (C20:1)	1.9
metil palmitato (C16:0)	13	metil behenato (C22:0)	1.9
metil palmitoleato (C16:1)	6.4	metil erucato (C22:1)	1.9
metil heptadecanoato (C17:0)	3.2		

Además, se utilizó ácido valérico (C5:0) (SIGMA) como estándar interno, y ácido butírico (C4:0) (SIGMA) para completar la serie de estándares.

Ácidos grasos libres (65)

Para separar los ácidos grasos libres, se transfirieron 2.5 mL de extracto lipídico en éter a un tubo con 100 mg de resina Amberlys A 26 almacenada en metanol, previamente lavada con NaOH 1M. El tubo se colocó en agitación a 150 rpm durante una hora, se eliminó el solvente y la resina se lavó 5 veces con 3.5 mL de éter-metanol (2:1). El extracto se evaporó a sequedad a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno.

Se adicionó 1 mL de agente metilante (se goteó 1 mL de cloruro de acetilo en 10 mL de metanol anhidro), en cada tubo y se incubó durante toda la noche a 30°C en oscuridad con 4 esferas de tamiz molecular (4Å, Sigma).

Después de la metilación se adicionó 1 mL de hexano y 1 mL de solución de NaCl saturada. La capa de hexano se retiró con pipeta Pasteur y se colocó en un vial para su análisis por cromatografía de gases en las condiciones antes descritas.

8.9. Pruebas microbiológicas en cepas puras

Para estandarizar la carga de microorganismos de cepas puras utilizadas en las pruebas de permeabilización y de especificidad de las sondas, se llevó a cabo la determinación de las cinéticas de crecimiento de cada género y su relación con las unidades formadoras de colonia (UFC) en cada caso.

Cinéticas de crecimiento

Todas las cinéticas de crecimiento se construyeron a partir de cepas puras aisladas de queso Cotija, (ver Tabla 8.3), conservadas en chaquiras y almacenadas a -70°C.

Se colocaron de 2 a 3 chaquiras en 20 mL de medio MRS en matraz Erlenmeyer de 50 mL y se incubó a 37°C a 250 rpm durante 24 h en el caso de *Enterococcus*. En el caso de *Staphylococcus* y *Bacillus* se colocaron de 2 a 3 chaquiras en 10 mL de medio BHI en un tubo de ensayo con tapa de rosca y se incubó a 37°C en estufa estática durante 24 h.

Tabla 8.3. Cepas puras utilizadas

Microorganismo	Origen	Trabajo
<i>S. psifermentans</i>	Queso Cotija	García-Saturnino, 2006
<i>B. pumilus</i>	Queso Cotija	Cortés-Díaz, 2009
<i>E. faecium</i>	Queso Cotija	Zúñiga-Bustos, 2009
<i>E. faecalis</i>	Queso Cotija	Serrano-Maldonado, 2010

Una vez transcurrido este tiempo se hizo un pase del 2% v/v de preinóculo en matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio y se incubó en las condiciones adecuadas.

Se tomaron lecturas de densidad óptica (D.O.) a $\lambda = 600$ nm cada hora. Cuando la D.O. rebasó la unidad, se llevaron a cabo diluciones y se corrigió el valor de absorbancia para graficar tiempo contra absorbancia o tiempo contra el logaritmo natural de D.O.

Determinación de UFC/mL por micrométodo

En función del comportamiento observado en la cinética de crecimiento se eligieron al menos cuatro puntos de muestreo para hacer cuenta en placa. Estos incluyeron $t=0$, al inicio de la fase log, a la mitad y al final.

Se llevaron a cabo diluciones que iban de 10^{-1} a 10^{-10} en solución salina al 0.85% p/v pH 7 estéril. Se prepararon cajas Petri con medio sólido de agar y se dividió cada caja en 3 sectores. Cada sector correspondía a una dilución, y cada caja a un tiempo.

Se tomaron 20 μ L de la dilución correspondiente y se colocaron por triplicado en el sector designado. Se permitió su absorción durante algunas horas y se incubaron las cajas a 37°C durante 24 h.

Se contabilizaron las UFC/20 μ L utilizando como criterio discriminativo valores de UFC de entre 20 y 200. Se realizó el cálculo del promedio y la multiplicación por el factor de dilución correspondiente para obtener UFC/mL.

Se graficó UFC/mL contra D.O. y se realizó el ajuste de regresión lineal. Para ver los resultados consultar el Anexo 3.

Cuenta en placa de bacterias

Se realizó cuenta en placa de los paquetes celulares obtenidos tratando una muestra de queso como se indica en el punto 8.13 de este apartado hasta el punto antes de la adición de paraformaldehído.

A partir de este pellet, se realizaron diluciones decimales en solución salina al 0.85% p/v, pH 7, estéril y se inoculó por duplicado, 1 mL de la dilución correspondiente en cada caja. Se agregaron de 18 a 20 mL del medio agar cuenta en placa fundido y mantenido a 45 °C. Para homogenizar, se mezclaron dentro de la campana de flujo laminar mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; cuidando que el medio no mojara la cubierta de las cajas.

Las cajas se dejaron solidificar y se incubaron en posición invertida durante 48 h a 35 ± 2 °C. Se incluyó una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.

Se tomaron en cuenta las cajas con las diluciones que contuvieran entre 25 y 250 UFC

8.10. Técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (49).

Fijación

Se preparó una solución de paraformaldehído al 4% p/v en buffer PBS (NaCl 8.9 g/L, KCl 0.2 g/L, Na_2HPO_4 1.44 g/L, NaH_2PO_4 0.24 g/L, pH 7.2-7.4). Para lograr la disolución completa del paraformaldehído en el buffer, se realizó un calentamiento a 60°C y se adicionaron de 3 a 5 gotas de sosa. Después la solución se refrigeró hasta su uso.

Un volumen de suspensión de células fue mezclado con tres volúmenes de solución fría de paraformaldehído al 4% p/v en buffer PBS estéril. La solución fijadora fue recién preparada, de no más de 24 horas.

La mezcla se incubó durante 16 h a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo, las células fueron concentradas por centrifugación en microcentrífuga a 12,000 rpm (13,300 G) durante 2 min a 4°C.

El pellet se lavó con buffer PBS para remover la solución fijadora y fue vuelto a centrifugar en las condiciones descritas. El pellet lavado se resuspendió en un volumen suficiente para llegar a una concentración de 10^8 a 10^9 células/mL en solución PBS-etanol (1:1) y se almacenó a -20°C hasta su uso por no más de 3 semanas.

Hibridación

Se colocaron 20 μ L de la suspensión de células fijas en PBS en un portaobjetos cubierto de poli-L-lisina y se secó en horno a 46°C durante 10 min.

El espécimen fue deshidratado por enjuagues sucesivos en 50 μ L de soluciones de etanol al 50, 80 y 100% v/v durante 3 minutos cada una y se dejó secar al aire entre una y otra. En este punto los portaobjetos podían ser almacenados a temperatura ambiente por tiempo indefinido.

Una vez que el etanol se hubo evaporado, se llevó a cabo un tratamiento enzimático que constó de dos pasos:

1. Los frotis celulares se cubrieron con 20 μ L de una solución de lisozima (Sigma, en buffer 100 mM Tris-HCl y 50 mM de EDTA, pH 8.0) a la concentración óptima para cada microorganismo y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente (66). Transcurrido este tiempo, se realizó un paso de lavado con buffer PBS enfriado en baño de hielo estéril.
2. Se llevó a cabo el segundo paso de tratamiento enzimático se llevó a cabo con 10 μ L de proteinasa K (Roche, en buffer 10 mM Tris-HCl, pH 7.5), a la concentración óptima, y se dejó incubar a 37°C durante 10 min. Nuevamente la reacción enzimática se detuvo con un paso de lavado con PBS enfriado en baño de hielo.

A partir de este momento, todos los pasos se llevaron a cabo en cuarto oscuro.

Se colocaron sobre el portaobjetos 30 μ L de buffer de hibridación (25% v/v de formamida, 0.9 M de NaCl, 0.01% p/v de SDS y 20 mM de Tris-HCl, pH 7.2), conteniendo 4 μ L de sonda universal ó 6 μ L de sonda específica para la detección en cultivo puro. En paquete celular extraído de queso Cotija se utilizaron 6 μ L de sonda universal ó 10 μ L de sonda específica.

Los portaobjetos se incubaron en cámara oscura con humedad controlada (se estabilizó la humedad con una solución de NaCl 1M, que es aproximadamente isotónica a la solución de

hibridación), a una temperatura de 42°C durante 5 horas para cultivos puros y durante toda la noche en muestras provenientes de queso.

Lavado

Una vez transcurrido el tiempo de hibridación, se realizó un paso de enjuague con agua destilada estéril y se dejó secar a temperatura ambiente en oscuridad.

Los especímenes fueron montados en una solución de glicerol al 50% v/v en buffer PBS y fueron observados inmediatamente.

8.11. Oligos utilizados en la técnica de FISH

En la Tabla 8.4 se muestran las secuencias de las sondas utilizadas, así como su marcaje en 5' y la referencia a partir de la cual se obtuvo. Todas ellas fueron sintetizadas y marcadas por Applied Biosystems.

Tabla 8.4. Secuencias y marcaje de las sondas utilizadas en la técnica de FISH

Microorganismo	Nombre	Secuencia (5'→3')	Referencia
Bacteria	EUB338	NED-GCTGCCTCCCGTAGGAGT	(63,84,90,91,92)
<i>Enterococcus</i> spp.	Escnt	PET-AAAGAGGAGTGGCGAACGGG	Este trabajo
<i>Staphylococcus</i> spp	Escsta	6FAM-GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATA	Este trabajo
<i>Bacillus</i> spp.	Porwal	PET-ACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTA	(93)

8.12. Pruebas de permeabilización celular

Se evaluaron distintas condiciones de tratamiento enzimático y los especímenes se tiñeron con safranina durante 1 min. Se enjuagaron con agua destilada para observar al microscopio óptico con el fin de identificar pérdida de morfología.

Se realizó una prueba preliminar con el tratamiento enzimático en las siguientes condiciones:

1. 20 µL de solución de lisozima, 1mg/mL, 5 min, temperatura ambiente.
2. 10 µL de solución de proteinasa K, 10 mg/mL, 10 min, 37°C.

Se utilizó en primer lugar lisozima porque al ser una N-acetilmuramidasa, es capaz de romper el enlace β-1,4-glicosídico entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina que conforman el peptidoglicano de la pared celular. En segundo lugar se adiciona la proteinasa K, que es una serinproteasa (su centro catalítico contiene el aminoácido serina acompañado por lo regular de histidina y ácido aspártico) capaz de romper el enlace peptídico que une por el grupo carboxilo aminoácidos alifáticos, aromáticos o hidrófobos en general, que son constituyentes característicos de proteínas embebidas en membrana (67).

En los casos en los que en la prueba preliminar se observó pérdida de la morfología celular, se realizaron ensayos en las siguientes condiciones haciendo todas las combinaciones posibles:

1. 20 μ L de solución de lisozima, 0.1 ó 0.5 ó 1 mg/mL, 5 min, temperatura ambiente.
2. 10 μ L de solución de proteinasa K, 1 ó 5 ó 10 mg/mL, 10 min, 37°C.

Y cuando la morfología se mantuvo, las condiciones del ensayo fueron las siguientes nuevamente haciendo todas las combinaciones posibles:

1. 20 μ L de solución de lisozima, 1 ó 5 ó 10 mg/mL, 5 min, temperatura ambiente.
2. 10 μ L de solución de proteinasa K, 1 ó 5 ó 10 mg/mL, 10 min, 37°C.

Se consideró tratamiento óptimo cuando la morfología se mantuvo intacta a las condiciones más drásticas posibles.

8.13. Extracción de paquete celular (28)

La pieza de queso Cotija se descongeló en refrigeración a 4°C durante 72 h y se pesaron 15 g en la campana de flujo laminar dentro de bolsas para Stomacher (Seward).

Se adicionó a cada muestra 40 mL de citrato de sodio al 2% p/v, pH 8.0 previamente estéril y se homogenizó en el Stomacher durante 2 min a alta velocidad para llevar a cabo la ruptura mecánica de la matriz del queso.

Se adicionó 1 mL de solución de Neutrasas (Novo Nordisk) con el fin de romper la red proteínica del queso y se mezcló a alta velocidad dentro del Stomacher durante 5 min.

Se incubó a 45°C durante 1 h a 100 rpm. Terminado este tiempo, la mezcla se dividió en dos tubos Falcon estériles de 50 mL y se centrifugó a 3,500 rpm (2,160 G) durante 7 min a 4°C para separar las fracciones proteínica y grasa de las células de microorganismos.

Se eliminó la capa de grasa de la superficie del tubo con un hisopo estéril y se transfirió la fase intermedia (la cual contenía las células) a un tubo de 50 mL estéril con ayuda de una micropipeta de 5 mL con puntas estériles.

Se centrifugó a 12,000 rpm (22,050 G) durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet 3 veces con solución salina al 0.85% p/v, pH 7.0, estéril, centrifugando en cada ocasión a las condiciones mencionadas en este punto.

El pellet lavado se resuspendió en 1 mL de solución salina y se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL. Se centrifugó a 12,000 rpm (13,300 G) en microcentrífuga durante 5 min y se eliminó el sobrenadante.

El pellet fue resuspendido en 0.5 mL de solución salina y se agregó 1.5 mL de solución de paraformaldehído al 4% p/v para llevar a cabo la fijación como lo describe el paso de fijación en el punto 8.10.

Tratamiento previo a la observación

Con la finalidad de eliminar la mayor cantidad posible de partículas autofluorescentes de la suspensión de células, se realizó el siguiente tratamiento después de la fijación con paraformaldehído.

Una vez lavado, el pellet se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL donde se resuspendió en 5 mL de PBS precalentado a 50°C y se añadieron 90 µL de tritón X100 al 0.05% v/v. La mezcla se incubó con agitación a 300 rpm durante 40 min a 50°C para tratar de solubilizar el material graso residual proveniente de queso.

La mezcla fue filtrada con equipo Millipore a vacío en prefiltros de la marca Millipore para eliminar las partículas más grandes y por último el líquido fue centrifugado a 12,000 rpm (13,300 G) durante 5 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante.

Los paquetes celulares fueron resuspendidos en 600 µL de una mezcla 1:1 de etanol-PBS frío y almacenados a -20°C hasta su uso.

8.14. Microscopía confocal

Para la visualización de todas las preparaciones se utilizó un microscopio confocal Olympus FV10-ASW [Versión 1.6] ubicado en la Unidad de Microscopía de la USAI de la Facultad de Química de la UNAM.

Se determinó experimentalmente la longitud de onda de máxima emisión de todos los fluoróforos con el fin de optimizar la captación de señal. Se colocaron 2 µL de oligo resuspendido en buffer sin diluir, en un portaobjetos de vidrio sin cobertura de poli-L-lisina y se observó directamente en el microscopio confocal. Se llevó a cabo un barrido de 450 a 700 nm y se obtuvieron los espectros (Figuras 8.2 a 8.5)

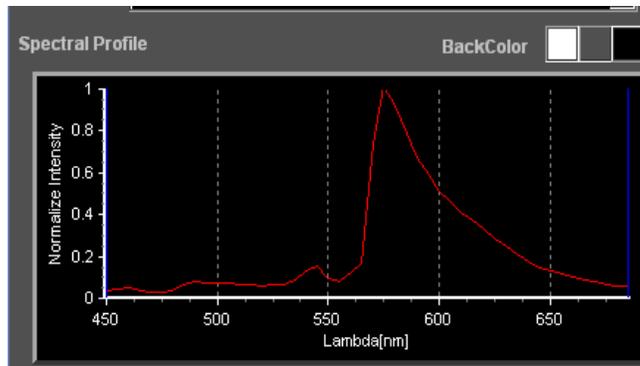


Fig. 8.2. Pico de emisión máxima para EUB338 marcado con NED

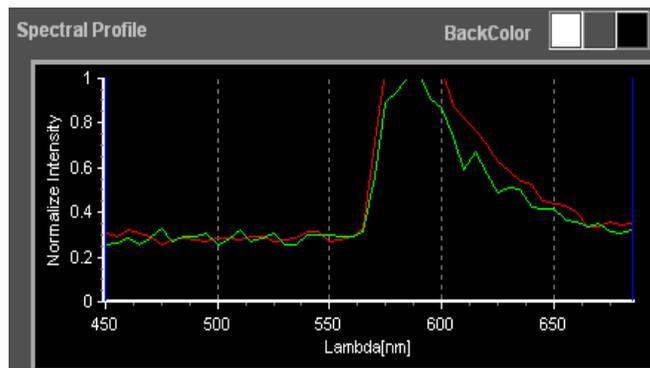


Fig. 8.3. Pico de emisión máxima para Escent marcado con PET

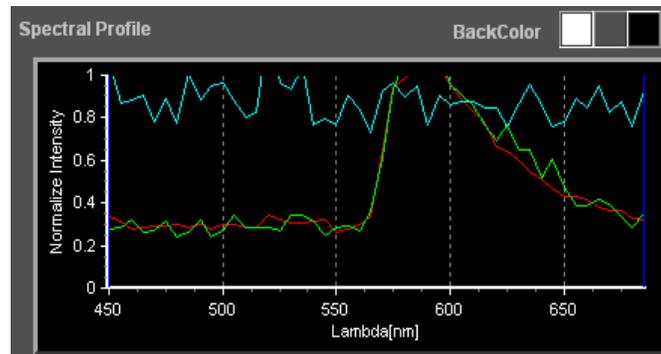


Fig. 8.4. Pico de emisión máxima para Porwal marcado con PET

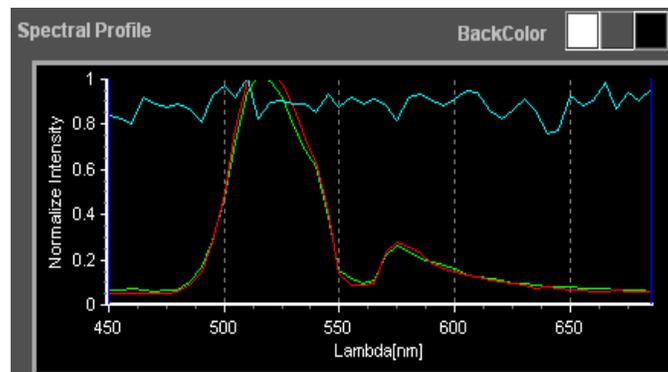


Fig. 8.5. Pico de emisión máxima para Escsta marcado con 6-FAM

Los espectros de ambas sondas marcadas con PET son idénticos, y los correspondientes a los fluoróforos NED y PET se traslapan, por lo que es posible verlos a ambos en un intervalo de longitud de onda de 560 a 600 nm.

Para garantizar la visualización únicamente de señal emitida por el fluoróforo, se ajustó la lectura con ayuda de controles negativos, es decir, preparaciones de células sin hibridar que se visualizaron siendo expuestas a la longitud de onda de excitación, lo que permitió eliminar la autofluorescencia de fondo de las imágenes, ver Anexo 7.

Se analizaron alrededor de 30 campos por cada hibridación con el objetivo 100X del microscopio confocal y se realizaron 3 hibridaciones independientes, de las cuales se contaron las células que presentaron señal positiva. Se calcularon promedios y desviaciones estándar así como la eficiencia de la hibridación en todos los casos.

9. Resultados y discusión

9.1 Resultados análisis fisicoquímico

Actividad acuosa (a_w)

Este parámetro es uno de los más importantes para el desarrollo de los microorganismos y la acción enzimática, por lo que ejerce una importante influencia sobre la maduración del producto.

Es posible observar la existencia de un gradiente que tiene su valor máximo en la zona central y mínimo en la zona 4. En la Figura 9.1.1 se muestra el comportamiento de la actividad acuosa en la pieza de queso, y en la Tabla 9.1.1 el promedio de tres determinaciones y la desviación estándar en cada caso.

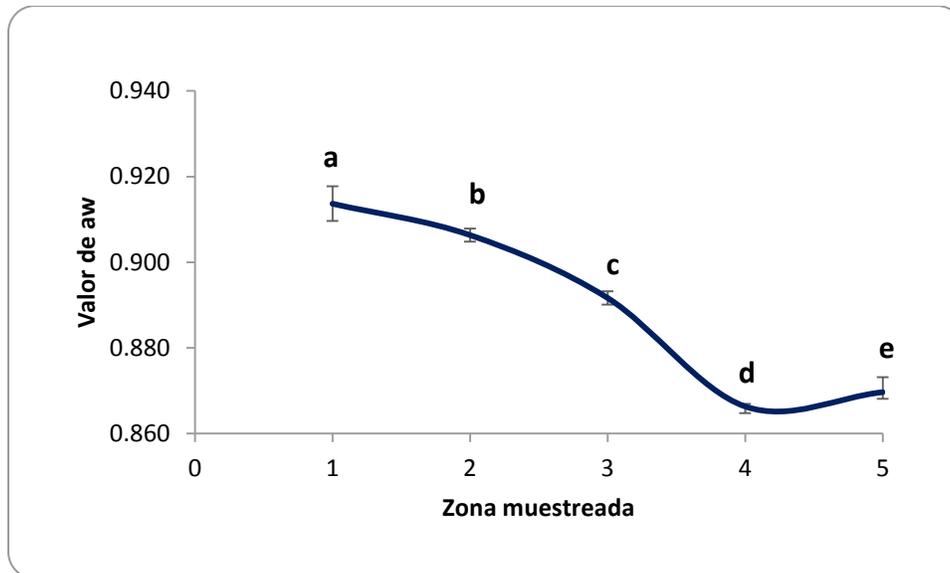


Fig. 9.1.1. Actividad acuosa en cada estrato.
Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$.

Tabla 9.1.1. Promedio de tres repeticiones de valores de a_w .

Zona	Promedio	SD
1	0.914 ^a	0.004
2	0.906 ^b	0.002
3	0.892 ^c	0.002
4	0.866 ^d	0.001
5	0.870 ^e	0.004

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$

Después de hacer el análisis estadístico por comparación de promedios individuales (Duncan, desglosado en el Anexo 4), se llegó a la conclusión de que todos los valores son estadísticamente diferentes entre sí con un nivel de confianza del 95%.

Este comportamiento indica que la zona central es la que tiene el valor más alto de actividad acuosa y que disminuye de forma pronunciada hacia las zonas superficiales, lo cual tiene lógica si se toma en cuenta que durante la maduración, la pieza se deshidrata de afuera hacia adentro. Llama la atención que el valor mínimo de a_w no corresponde a la corteza, sino a la zona inmediata (zona 4), es decir que posiblemente debido a que tiene contacto con la humedad ambiental se podría generar un equilibrio en esa zona que produzca un a_w ligeramente más elevado.

Si se considera que la mayoría de las bacterias requieren una actividad de agua aproximada de 0.92 para crecer (6), la microbiota de este alimento será seleccionada en primer lugar por este parámetro. El valor máximo de actividad acuosa en la zona central no alcanza el valor de 0.92 (Tabla 9.1.1).

Los valores obtenidos para las zonas centrales (0.906-0.914), se prestan para el desarrollo de *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus*, que son microorganismos que se han identificado en trabajos anteriores en queso Cotija. En las zonas medias, los valores se encuentran en el intervalo de 0.866-0.892, donde se podrían desarrollar bacterias halotolerantes, por ejemplo del género *Staphylococcus* así como levaduras, lo mismo que en la superficie. Se ha reportado miembros de los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus* que son halotolerantes (68).

Contenido de sal

El contenido de cloruro de sodio se determinó en función al contenido de cloruros en la muestra por método volumétrico.

Al igual que en el caso de la actividad acuosa, en este caso la pieza de queso presenta un gradiente de concentración de cloruros muy claro que se muestra en la Figura 9.1.2. En la Tabla 8.1.2 se encuentran los promedios de tres repeticiones con la respectiva desviación estándar.

Con un nivel de confianza del 95%, los valores de contenido de sal obtenidos para cada estrato son estadísticamente diferentes entre sí. Es decir, existe un gradiente de contenido de sal en la pieza.

En el queso Cotija, de acuerdo a lo especificado por la Asociación Regional de Productores de Queso Cotija (19), el salado ocurre en un solo paso al adicionar sal de mar en el momento de amasar la pasta recién desuerada, por lo que al inicio de la maduración se obtiene de una mezcla homogénea que después de tres meses de maduración termina por formar un gradiente de sal. Este fenómeno tendría que estar necesariamente asociado a la pérdida de humedad, es decir, el gradiente se forma a partir de la difusión del soluto desde zonas de mayor concentración hacia zonas de menor concentración, a la vez que se pierde humedad desde la superficie.

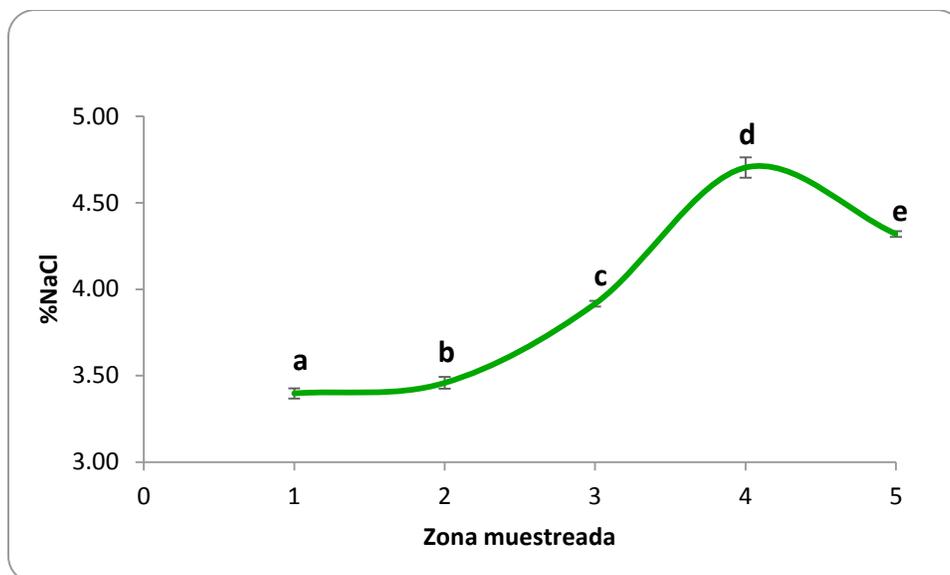


Fig. 9.1.2. Cuantificación de NaCl en cada estrato. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$.

Tabla 9.1.2. Promedio de tres repeticiones de valores de NaCl.

Zona	Promedio (%)	SD
1	3.40 ^a	0.03
2	3.46 ^b	0.03
3	3.92 ^c	0.02
4	4.70 ^d	0.06
5	4.32 ^e	0.02

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$

A mayor pérdida de humedad, la sal se concentra en la superficie y comienza a migrar hacia zonas de menor concentración, hasta alcanzar un equilibrio, que nunca llega a estabilizarse debido a la continua pérdida de agua. Cabe mencionar que el fenómeno de difusión ocurre a menor rapidez que la pérdida superficial de humedad.

Nuevamente la corteza presenta un comportamiento distinto que se puede asociar al aumento de actividad acuosa analizado en la sección anterior.

En cuanto a la diversidad microbiana, en general en todo el alimento la concentración de sal se encuentra en el intervalo de 3.4 a 4.7%, valores que permitirían el desarrollo de bacterias halófilas débiles y halotolerantes, tales como algunos géneros de *Staphylococcus*. Estos valores corresponden a la salinidad próxima del agua de mar (óptimo entre 2 a 5% de NaCl), (8) y a la concentración de sal de la mayoría de los quesos madurados (4.5%), (4).

Potencial de hidrógeno

En la pieza de queso se pudo constatar la presencia de un gradiente de pH en el interior con una gran diferencia con respecto a lo observado en la superficie. En la Figura 9.1.3 se muestran los resultados obtenidos y en la Tabla 9.1.3 el promedio de tres determinaciones, cuyo análisis estadístico reveló diferencia significativa entre los promedios de todas las zonas con un nivel de confianza del 95%.

El gradiente establecido en este caso va de la mano con la presencia de bacterias lácticas (BAL). Se espera que a mayor profundidad, donde las condiciones de anaerobiosis y actividad acuosa se vean favorecidas, y donde se obtiene el menor pH, se favorezca la presencia de este tipo de microorganismos así como mayor actividad proteolítica.

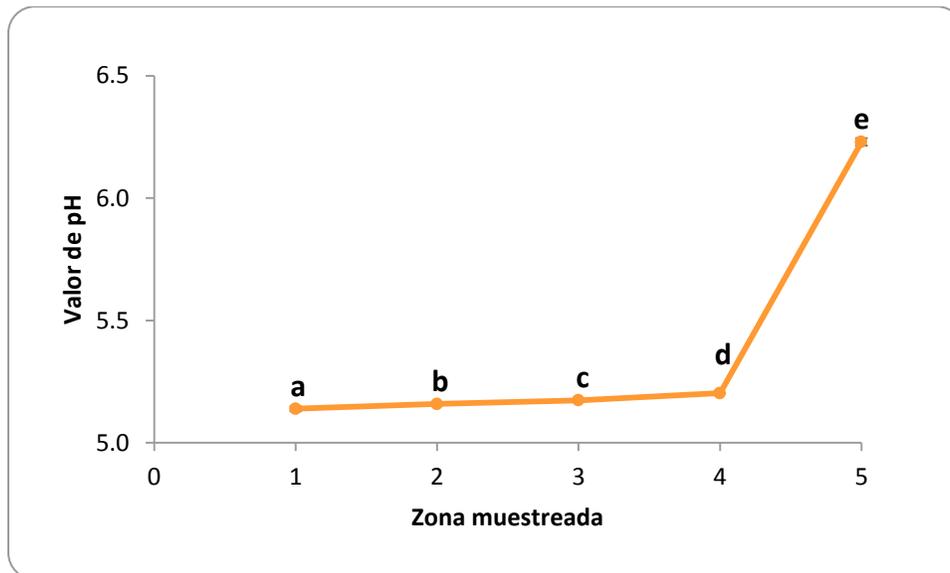


Fig. 9.1.3. Cuantificación de pH cada estrato.
Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$.

Tabla 9.1.3. Promedio de tres repeticiones de valores de pH.

Zona	Promedio	SD
1	5.139 ^a	0.009
2	5.158 ^b	0.002
3	5.173 ^c	0.006
4	5.202 ^d	0.001
5	6.229 ^e	0.015

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$

Aunque el intervalo de pH para las zonas centrales permite el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos, en el queso Cotija las bacterias lácticas de mayor importancia son *Enterococcus* y *Lactobacillus*.

El pH en la corteza es sustancialmente más alto debido seguramente a la menor cantidad de bacterias productoras de ácido láctico y la posible colonización por otro tipo de bacterias aerobias no productoras de acidez.

El pH se modifica por la acción de enzimas con actividad proteolítica y lipolítica. La proteólisis tendría como consecuencia general un aumento en el pH, mientras que la lipolisis lo disminuiría (6).

Ácido láctico

El contenido de esta especie en cualquier muestra de origen lácteo es producto del metabolismo de BAL que transforman la lactosa en ácido láctico capaz de modificar el pH del entorno afectando así el desarrollo de la microbiota en dicha zona.

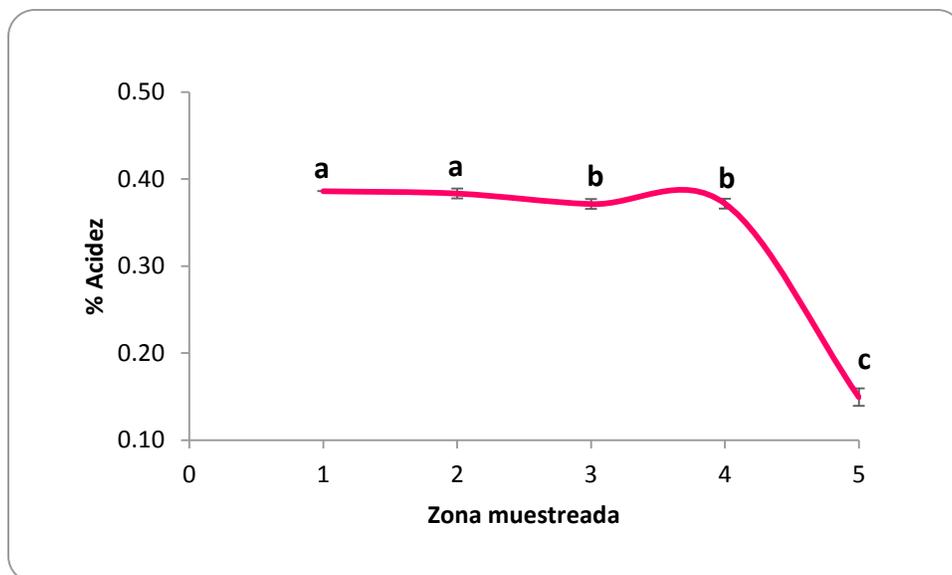


Fig. 9.1.4. Cuantificación de acidez cada estrato. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$.

Tabla 9.1.4. Promedio de tres repeticiones de valores de % ácido láctico.

Zona	Promedio (%)	SD
1	0.39 ^a	6.8 X10 ⁻¹⁷
2	0.38 ^a	5.7 X10 ⁻⁰³
3	0.37 ^b	5.7 X10 ⁻⁰³
4	0.37 ^b	5.8 X10 ⁻⁰³
5	0.15 ^c	1.0 X10 ⁻⁰²

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$

En la Figura 9.1.4 se muestran los resultados, mismos que después de ser sometidos a análisis estadístico arrojan la presencia de un gradiente pero en este caso menos pronunciado de lo que

se había observado con los parámetros anteriores. En la Tabla 9.1.4 se muestran los promedios y desviación estándar calculados en cada estrato.

De acuerdo a la prueba de Duncan, sólo es posible distinguir tres estratos: el centro de la pieza que abarca las zonas 1 y 2, la zona media (zonas 3 y 4) y por último la corteza que corresponde a la zona 5.

Esto podría deberse a que la acidez titulable se calcula por adición de hidróxido de sodio a una concentración conocida hasta que se han neutralizado todas las especies ácidas en suspensión. Esta determinación se podría ver afectada no sólo por la presencia de ácidos orgánicos, sino por el equilibrio existente con los grupos funcionales de restos aminoácidos que forman parte de las abundantes proteínas en el medio, lo que podría amortiguar hasta cierto punto la neutralización de especies dando valores parecidos entre zonas cercanas.

De cualquier forma, la presencia de lactato en el queso muestra un gradiente de concentración y se ve claramente disminuido en la corteza, donde se esperará una disminución en la carga de bacterias ácido lácticas.

Contenido de calcio

El contenido de calcio en la muestra será el que haya estado presente en la materia prima con la que fue fabricado el queso y que no se haya perdido durante el desuerado, pues este componente no es enriquecido en ningún momento de la elaboración.

A continuación en la Figura 9.1.5 se muestra el contenido de calcio en la muestra en función del estrato muestreado, y en la Tabla 9.1.5, el promedio de tres determinaciones y su respectiva desviación estándar. Es claro que en este caso existe diferencia entre los datos obtenidos, pues el análisis estadístico muestra un comportamiento similar al observado para los datos de acidez, es decir, estadísticamente existen sólo tres estratos bien definidos donde el centro (zonas 1 y 2) corresponde a la mínima concentración de calcio, seguido del estrato medio (zonas 3 y 4) y por último el externo (correspondiente a la corteza o zona 5), con el mayor contenido de calcio.

El calcio en la muestra se encuentra ligado por interacciones iónicas con estructuras de carga neta negativa proveniente de las caseínas fosfatadas que se exponen después de la acción del cuajo durante el proceso de coagulación de la leche, lo que contribuye a estabilizar la red y al proceso de desuerado. La mayor concentración de calcio en la corteza se puede explicar debido únicamente a la pérdida de humedad en las zonas más cercanas a la superficie.

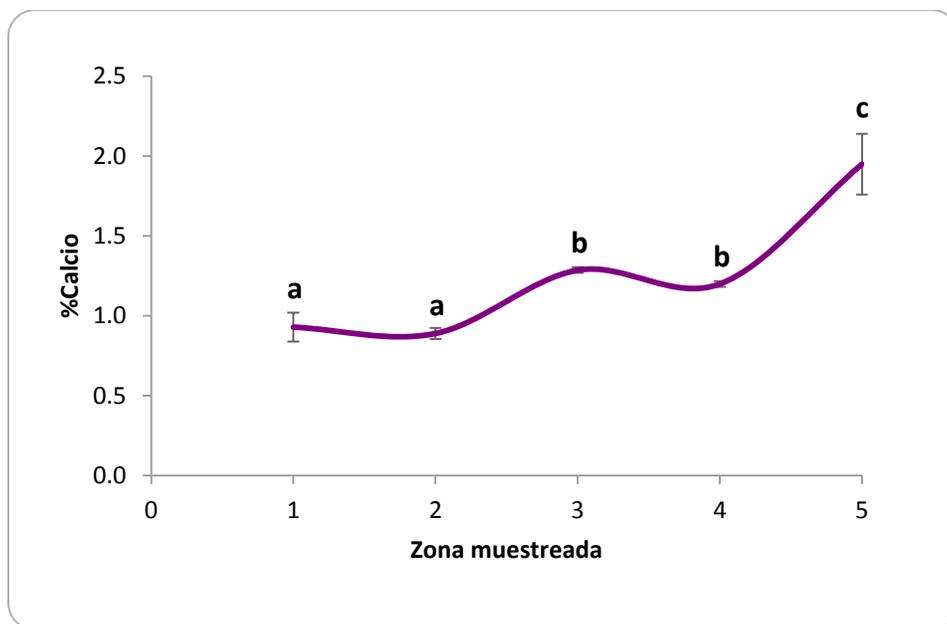


Fig. 9.1.5. Cuantificación del contenido de calcio en cada estrato. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$.

Tabla 9.1.5. Promedio de tres repeticiones de valores de %Calcio.

Zona	Promedio (%)	SD
1	0.9291 ^a	0.0902
2	0.8895 ^a	0.0348
3	1.2861 ^b	0.0179
4	1.1994 ^b	0.0178
5	1.9492 ^c	0.1909

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$

Potencial redox (Eh)

Este parámetro permite la obtención de información acerca del tipo de atmósfera a la que se encuentran expuestos los microorganismos (aerobiosis o anaerobiosis), en términos cuantitativos, lo que permite predecir el tipo de microbiota que se verá favorecida en la matriz del queso.

Se presentan en la Tabla 9.1.6 los resultados del promedio de 5 repeticiones para cada zona así como el gráfico que ilustra su comportamiento (Figura 9.1.6).

Todos los valores de potencial redox corresponden a valores negativos que van desde -116 hasta -140 mV aproximadamente. Esto indica que la atmósfera dentro de la pieza es deficiente de oxígeno, es decir que predomina un ambiente reductor debido a la disminución de este gas como resultado de metabolismo de bacterias aerobias en primer lugar, así como la generación de especies reductoras producto de su metabolismo.

En quesos madurados se han reportado valores típicos de alrededor de -240 a -250 mV (6), valor que todavía dista de los obtenidos en este ensayo probablemente debido a que la pasta del queso no es totalmente compacta (friable), lo que probablemente implique la formación de “microcanales” que favorezcan la entrada de aire ya que la corteza no es lo suficientemente impermeable.

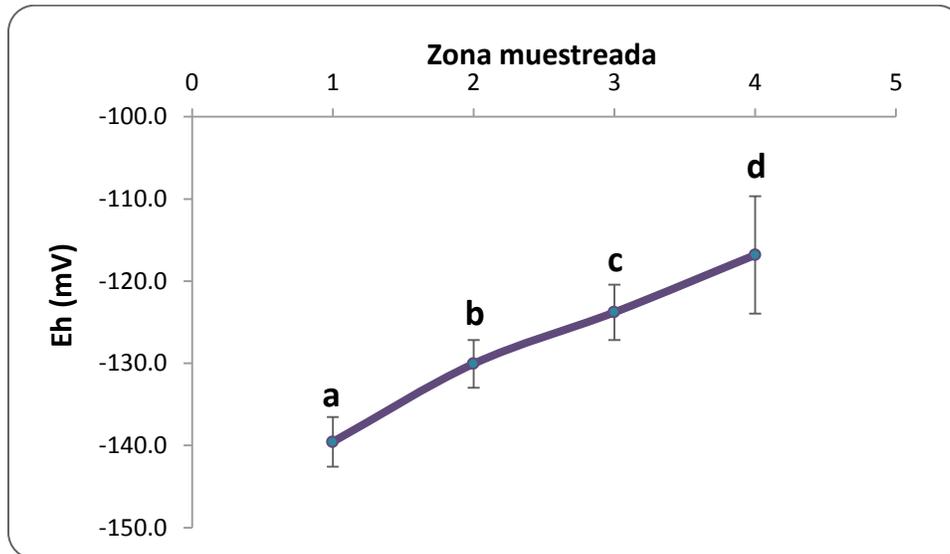


Fig. 9.1.6. Determinación del potencial redox. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$.

Tabla 9.1.6. Promedio de tres repeticiones de potencial redox.

Zona	Promedio (mV)	SD
1	-139.6 ^a	7.2
2	-130.1 ^b	3.4
3	-123.8 ^c	2.9
4	-116.8 ^d	3.0

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$

La existencia del gradiente se puede explicar poniendo de manifiesto que entre más cercano a la corteza haya sido el muestreo, la zona se encontrará más expuesta a la difusión de oxígeno ambiental. La consecuencia inmediata sería una mayor prevalencia de microorganismos preferentemente anaerobios facultativos y microaerófilos en el centro de la pieza, sobre aquellos aerobios en la superficie. De cualquier forma, como todas las cepas de interés son anaerobios facultativos y el intervalo de valores de potencial redox permiten el desarrollo de todos ellos, es probable que el Eh no sea un factor determinante en su distribución.

En estas condiciones se puede esperar la presencia de microorganismos anaerobios facultativos: que crecen bajo condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas tales como enterobacterias y estafilococos; así como de bacterias microaerofilas que crecen en tensiones de oxígeno mínimas y lo metabolizan utilizándolo como aceptor final de electrones, por ejemplo *Lactobacillus* y *Streptococcus* (incluyendo a *Enterococcus*).

Fue imposible registrar las lecturas en la corteza debido a que estas fluctuaban demasiado, ya que los electrodos debieron insertarse no más de 0.5 cm en la superficie, lo que los dejaba expuestos al contacto con el aire ambiental.

Perfil electroforético

Diferentes proteasas son capaces de actuar conjuntamente sobre la matriz del queso, incluyendo las enzimas del cuajo que permanecen activas durante la maduración, así como las proteasas nativas de la leche y proteasas bacterianas procedentes de la microbiota.

Como punto de partida, se presenta a continuación en la Figura 9.1.7a el perfil electroforético de las proteínas de una muestra de leche cruda (69), en el que se observan teñidas con mayor intensidad las bandas correspondientes a las caseínas, cuyos valores de peso molecular se encuentran entre 19 y 25 kDa (α_{S1} , α_{S2} , β y κ caseínas de 23.6, 25.2, 24 y 19 kDa respectivamente). El resto de las bandas tenues que se observan alrededor de 14 kDa probablemente correspondan a las proteínas del lactosuero, entre las se encuentran como mayoritarias α -lactalbúmina y β -lactoglobulina (14.4, 18.4 kDa respectivamente).

Por último, las trazas que se observan en pesos moleculares de aproximadamente 60 kDa corresponderían a la presencia de albúmina, cuyo peso molecular es de 66.5 kDa.

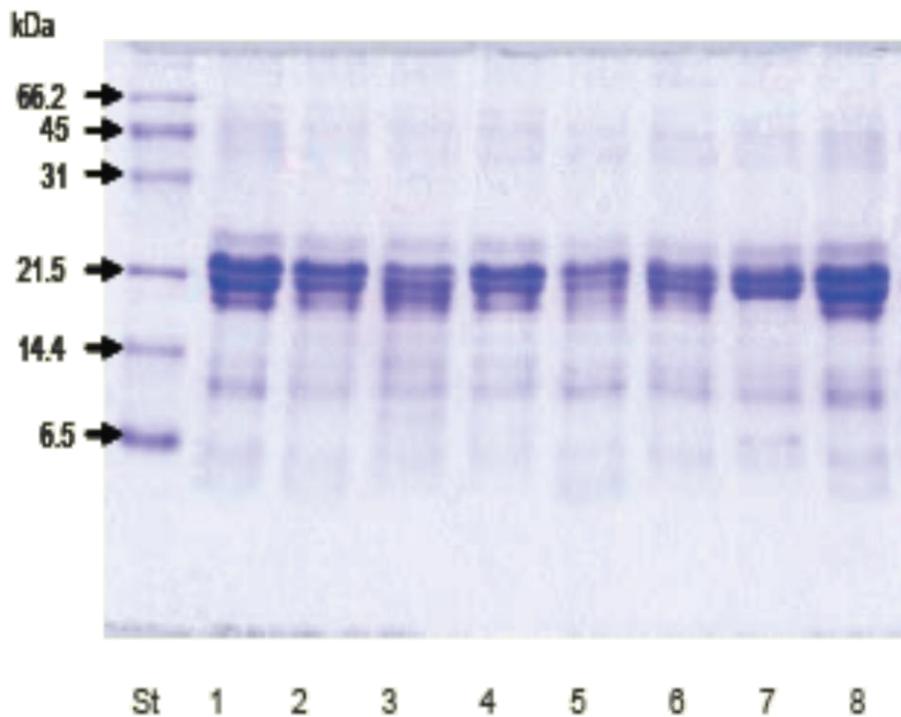


Fig. 9.1.7a. SDS-PAGE de 8 muestras de leche de vaca con la misma concentración de proteína por pozo. En carril 1 marcador de peso molecular. Tinción con Coomassie. (87).

Cabe mencionar que aun cuando todas las muestras provienen de la misma matriz alimentaria, se observan diferencias en los perfiles electroforéticos que podrían relacionarse con diferencias en la forma de alimentación de las vacas, la época de la ordeña, la raza de los animales, etc.

Al comparar contra el perfil electroforético de las proteínas totales de cada zona de queso Cotija analizado en este trabajo, (Figura 9.1.7b), se observa la aparición de bandas por debajo de 20 kDa que podrían corresponder segmentos generados por hidrólisis de las caseínas.

En primer lugar, salta a la vista la presencia de tres bandas muy intensas entre 25 y alrededor de 40 kDa en todos los carriles. Se esperaría que estas tres bandas, por ser las más abundantes correspondan a las α_{s2} , β , y α_{s1} caseínas en ese orden de mayor a menor peso molecular, mismas que se esperaría observar en 25.2, 24 y 23.5 kDa respectivamente, aunque de acuerdo al marcador de peso molecular, estas bandas corresponden a proteínas de mayor peso, en cuyo caso, las bandas corresponderían (de más ligera a más pesada) a comigraciones de α y β caseínas alrededor de 25 kDa y las dos siguientes, de entre 35 y 40 kDa podrían corresponder a asociaciones de α_{s1} , α_{s2} ó β con κ -paracaseína, lo cual presentaría pesos moleculares de 37.1, 38.7 y 37.5 kDa respectivamente (4).

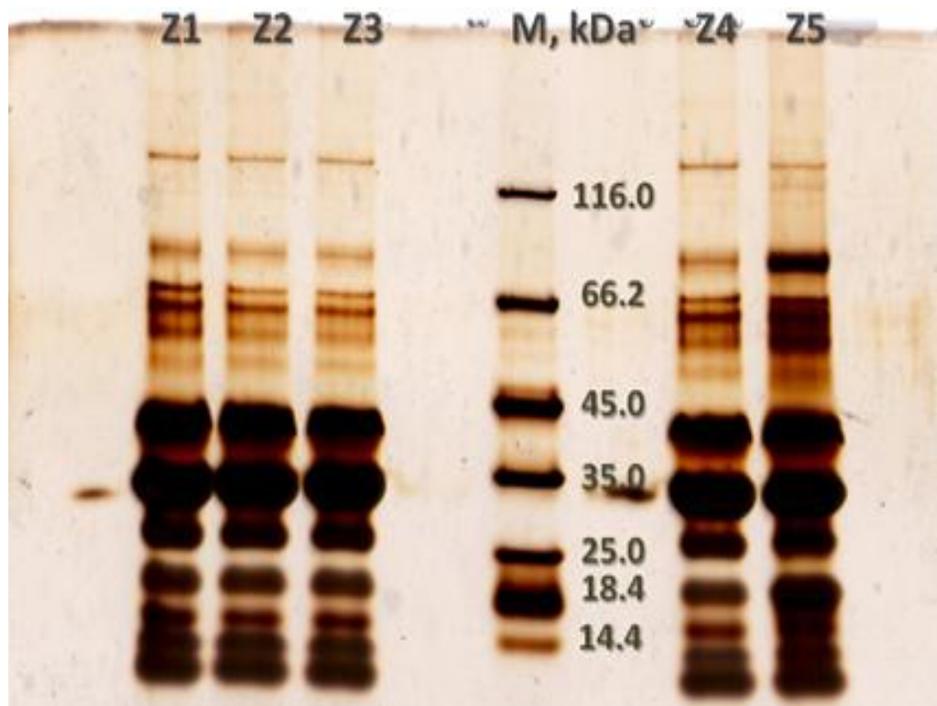


Fig. 9.1.7b. SDS-PAGE al 12% de proteínas de queso de cada zona de queso Cotija. 120 μ g de proteína/pozo. Tinción con plata.

Estas asociaciones son posibles debido a interacciones hidrofóbicas de las caseínas.

Por debajo de 25 kDa se observan 4 bandas bien definidas, que analizándolas de la más ligera a la más pesada, podrían corresponder a caseinomacropéptido no glucosilado (6.5 kDa), κ -paracaseína libre (13.5 kDa), κ -caseína residual (19 kDa) y caseinomacropéptido glucosilado (alrededor de 20 kDa dependiendo el grado de glucosilación) (18).

Además, se observan otras bandas tenues de alto peso molecular que pudieran ser proteínas provenientes del suero tales como cadenas pesadas de inmunoglobulinas de arriba de 60 kDa, seroalbúminas (66.2 kDa) y/o lactoferrinas de alrededor de 88 kDa (70).

Para completar el análisis, se evaluaron por separado el estado de hidrólisis de la fracción soluble del extracto protéico del queso y la fracción de caseínas. De este modo se espera poner de manifiesto diferencias en los perfiles.

Evaluación de proteína soluble y caseínas

La cantidad de proteína soluble presente en cada uno de los estratos podría ser un indicativo del grado de proteólisis que la muestra ha sufrido, por esta razón se evaluó independientemente.

En la Figura 9.1.8 se muestra el comportamiento de la concentración de proteína soluble en cada estrato determinada por el método de Lowry (para ver curva de calibración ir a Anexo 2), y en la Tabla 9.1.7, el promedio de tres determinaciones y su respectiva desviación estándar.

La concentración de proteína soluble se eleva de forma significativa únicamente en la zona 5, lo que podría indicar un incremento de la actividad proteolítica en la corteza del queso, mientras que en el resto de las zonas esta concentración se mantiene estadísticamente constante.

Esto indica una mayor actividad proteolítica en la corteza dada ya sea por una mayor variedad de microorganismos proteolíticos o por una mayor cantidad de los mismos. Esto sorprende porque es en esta zona donde se presenta la menor actividad de agua y la mayor concentración de sal, lo que se esperaría repercutiera de forma negativa en la actividad enzimática.

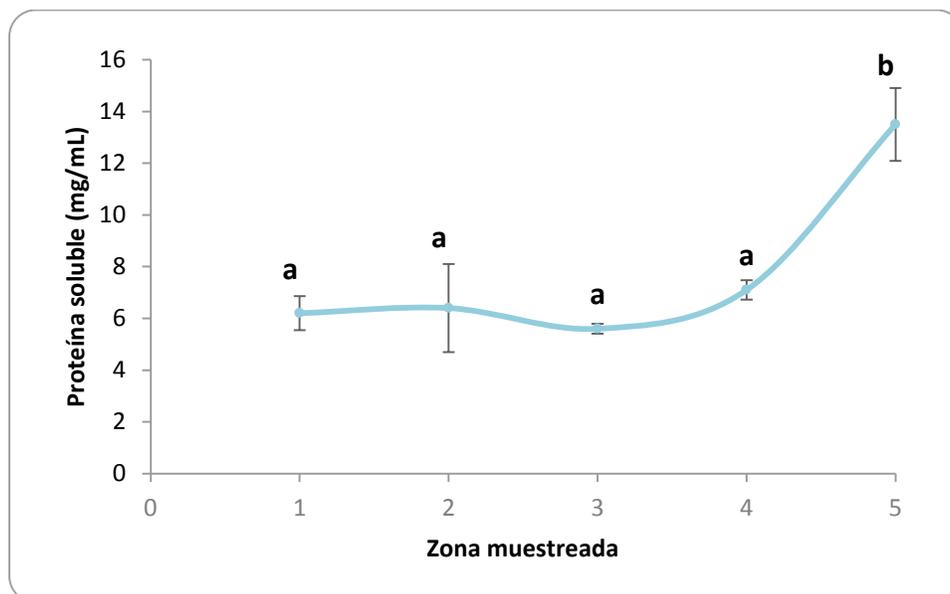


Fig. 9.1.8. Cuantificación proteína soluble por el método de Lowry. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$.

Tabla 9.1.7. Promedio de tres repeticiones de proteína soluble.

Zona	Promedio (mg/mL)	DS
1	6.2 ^a	0.66
2	6.4 ^a	1.70
3	5.6 ^a	0.19
4	7.1 ^a	0.38
5	13.5 ^b	1.41

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$.

Para evaluar el estado de las proteínas que integran la fracción soluble del queso, se realizó el análisis electroforético mostrado en la Figura 9.1.8a. donde se observa que el perfil de proteínas en todas las zonas es similar. Sólo en la zona 5 se observa un incremento en la intensidad de las bandas.

Es decir que la proteólisis diferencial observada en la cuantificación de proteína soluble, no está ocurriendo sobre las proteínas que conforman la fracción soluble.

Con el fin de establecer dónde se encuentra la diferencia de proteólisis de la zona 5, se extrajo la fracción de caseínas por precipitación y se realizó un nuevo análisis electroforético (Figura 9.1.8b). En este gel se observa en el carril correspondiente a la zona 5, una disminución en la intensidad de las bandas mayoritarias correspondientes a las caseínas y la completa desaparición de la banda de 25 kDa que se encuentra debajo de las caseínas más abundantes (correspondiente probablemente a κ -caseína aunque aparece a 25 kDa y no a 20 donde se esperaría).

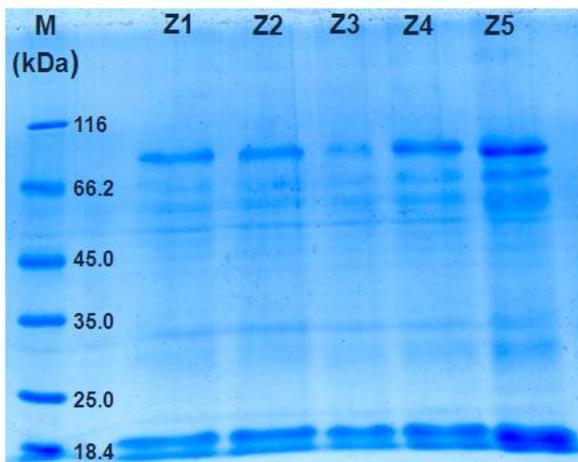


Fig. 9.1.8a. Electroforesis SDS-PAGE (12%) de fracción soluble teñida con Coomassie. 120 μ g de proteína/pozo.

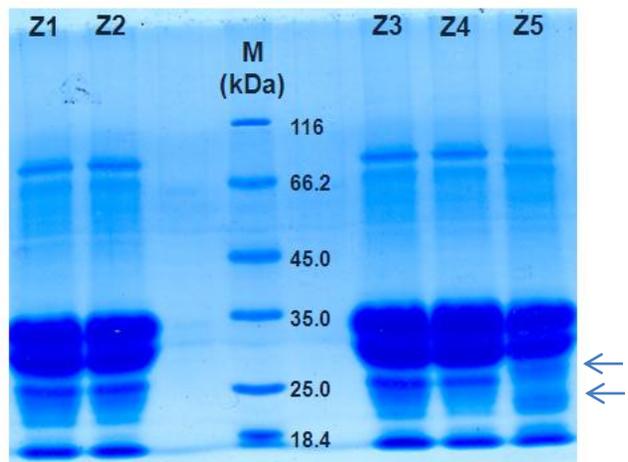


Fig. 9.1.8b. Electroforesis SDS-PAGE (12%) de caseínas teñida con Coomassie. 120 μ g de proteína/pozo.

Esto podría indicar hidrólisis sobre este componente de la caseína, característico de endopeptidasas exocelulares como las que podrían liberar lactococos, lactobacilos o enterococos, todos anaerobios facultativos (25).

Aparecen también en este carril dos bandas que no están presentes en el resto de los carriles (indicadas con flechas azules en la Figura 9.1.8b.), que podrían ser productos de la degradación de otras proteína de mayor peso molecular.

Lo anterior indica degradación diferencial en la corteza con respecto al resto de las zonas debido posiblemente a una mayor actividad proteolítica aunada a una mayor carga microbiana en la zona más expuesta al ambiente y a la manipulación del alimento, lo que es congruente con la cuantificación de proteína soluble.

La similitud en los perfiles electroforéticos indica que la hidrólisis de las proteínas mayoritarias en el queso (caseínas), ocurre dentro de la matriz de forma homogénea sin importar el gradiente de actividad de agua o la concentración de sales, lo que implica que en todos los casos existen condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos proteolíticos así como para su actividad enzimática.

Los microorganismos que llevan a cabo tanto hidrólisis de proteínas como fermentación ácida son los llamados ácido-proteolíticos tales como *Enterococcus faecalis* y *Micrococcus caseolyticus*.

Se ha detectado que *E. faecalis* produce una proteasa exocelular. En cuanto a *E. faecium* y *E. durans*, ambos están dotados de actividad extracelular comparable con la de los estreptococos lácticos (25).

Se esperaría encontrar a los microorganismos responsables de actividad proteolítica distribuidos homogéneamente dentro de la matriz del queso.

Análisis de ácidos grasos

En la industria de productos lácteos, las lipasas desempeñan un papel importante en la maduración de quesos, ya que los ácidos grasos liberados por la acción hidrolítica de estas enzimas contribuyen a la aparición de sabores y olores característicos.

Se tienen antecedentes de la presencia de actividad lipolítica en cepas de *Staphylococcus* spp. y *Bacillus pumilus* aisladas de queso Cotija.

Ácidos grasos totales (AGT)

Se obtuvieron datos sobre la composición de los ácidos grasos presentes en el material lipídico, poniendo de manifiesto que los AGT es la suma de los ácidos grasos libres (AGL) más los que están unidos a gliceroles.

Este análisis resultó en la siguiente composición de ácidos grasos totales (Figura 9.1.9a), que estadísticamente es la mismo en todas las zonas. No se esperaba diferencia entre cada una de ellas, pues no hay razón alguna para que la composición varíe si se parte de la misma materia prima, a menos que existiera en alguna de ellas la degradación total de los ácidos grasos y por ende su desaparición.

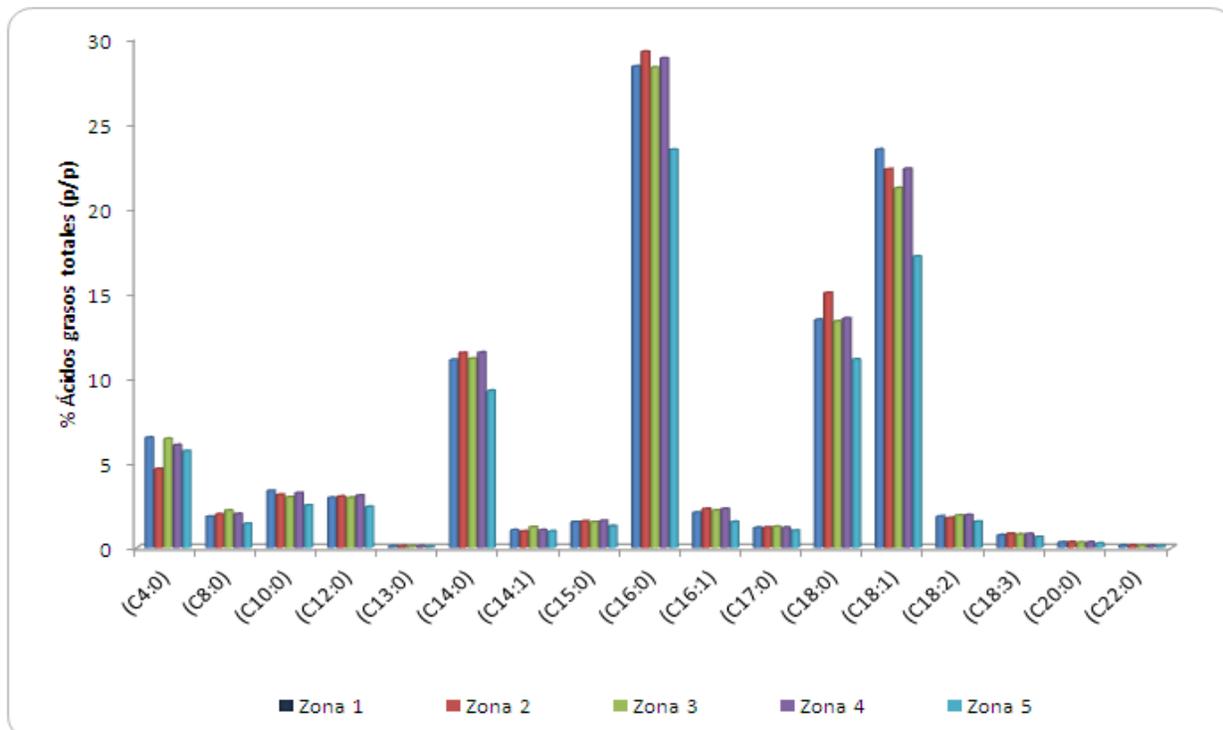


Fig. 9.1.9a. Composición de ácidos grasos totales de queso Cotija.

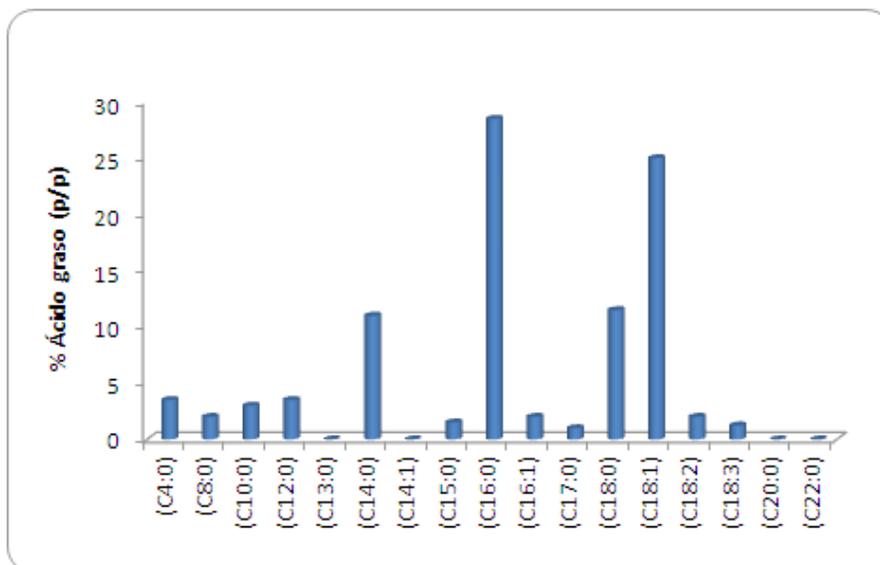


Fig. 9.1.9b. Composición de ácidos grasos de leche bronca (71).

En la Figura 9.1.9b, se presenta el perfil de ácidos grasos ideal en leche cruda de vaca Holstein de acuerdo a la American Dairy Science Association en el 2002 (71). Este perfil proporcionalmente es muy parecido al de la Figura 9.1.9a, lo cual es lógico, pues esta materia prima es la única fuente de grasa en el queso Cotija.

Al igual que en el queso Cotija, en este material lipídico los ácidos grasos más abundantes son palmítico, oléico, mirístico y esteárico.

Ácidos grasos libres (AGL)

Una vez que se conoce el perfil completo de ácidos grasos del queso, es posible con este análisis observar la liberación de ácidos grasos en la pieza.

A continuación se muestra en el Figura 9.1.10, el perfil de ácidos grasos libres en cada una de las zonas expresado en mg de ácido graso por cada 100 mg del total de ácidos grasos libres. Este análisis es independiente del rendimiento de la extracción en cada zona (ver Tabla 9.1.8), puesto que el ajuste se realizó tomando en cuenta la proporción de ácidos grasos de acuerdo al total extraído. El porcentaje de recuperación del estándar es tan bajo debido a la excesiva manipulación de la muestra que implica la metodología. Se adicionaron 50 μ L de estándar, equivalentes a 50.5 mg ($\delta = 1.01$ g/mL), a cada muestra de grasa antes de someter a metilación y se partió de aproximadamente 100 mg de grasa para metilar.

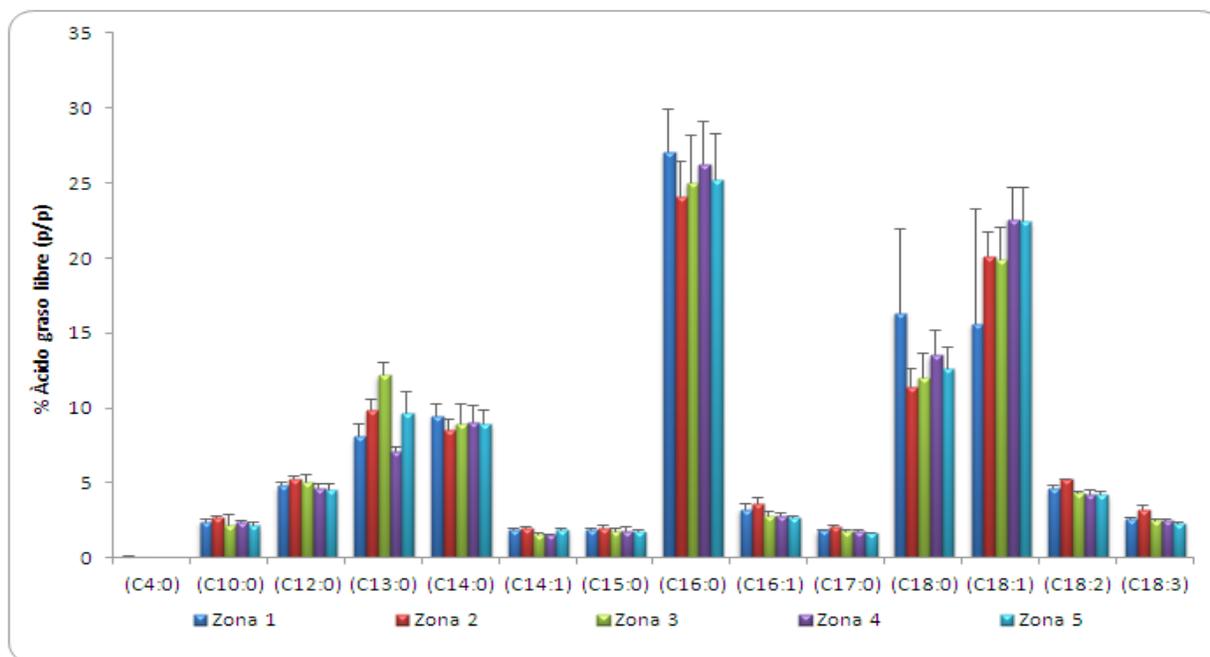


Fig. 9.1.10. Composición de la mezcla de ácidos grasos libres.

Tabla 8.1.8. Recuperación de estándar interno.

Zona	Concentración de ác. valérico (mg/mL)	Recuperación del estándar (%)*
1	0.0004	1.2781
2	0.0003	0.9665
3	0.0006	1.3075
4	0.0004	1.4277
5	0.0006	1.4406

*En función a los miligramos de material lipídico pesado antes de la extracción de AGL.

Para todos ácidos grasos estudiados, la concentración de cada uno de ellos resultó ser estadísticamente igual en todas las zonas, exceptuando el ácido butírico, que pudo detectarse únicamente en la zona 1. A este respecto, el C:4 ocupa alrededor del 5% de composición de los ácidos grasos totales, aunque como ácido graso libre no se detecta más que en una zona y es

menor al 1 %. Esto podría explicarse pensando que todo o casi todo el ácido butírico de la grasa de queso sigue esterificado después de 3 meses de maduración o, al ser un ácido graso de cadena corta y muy volátil, es posible que se haya perdido durante la manipulación de las muestras y que no lo hayamos visto en el extracto.

Llama la atención que el ácido graso libre C13:0 aparece entre el 7 y el 12%, comparado con el perfil de ácidos grasos totales, donde no rebasa el 2%. La liberación preferencial del ácido tridecanóico podría explicarse debido a que probablemente se encuentre en posiciones 1 o 3 del triacilglicerol, que son las posiciones preferenciales en las que ocurre la lipólisis (6).

En ninguna zona se pudo identificar el pico correspondiente al ácido octanóico (C8:0) ni el de los ácidos grasos de cadena de más de 18 carbonos, debido posiblemente a que no son sustratos para las lipasas que pudieran encontrarse en el queso, por lo que estarían esterificados.

Otro caso que llama la atención es el del C18:2, que en el análisis de ácidos grasos totales ocupa menos del 5% (del 2 a 3 %), mientras que en el análisis de ácidos grasos libres alcanza una proporción del 5%, lo que nos lleva a pensar que es uno de los sustratos preferentes. Otros sustratos preferentes por abundancia serían el C16:0 (ácido palmítico), C18:0 (ácido esteárico) y C18:1 (ácido oléico).

La liberación de ácidos grasos ocurre dentro de la matriz del queso y en la corteza de forma homogénea sin importar el gradiente de actividad de agua, pH o la concentración de sales, lo que implica que en todos los casos existen condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos lipolíticos así como para su actividad enzimática.

Dentro de grupo de trabajo se caracterizó una lipasa de *Bacillus pumilus* aislado de queso Cotija, misma que resultó tener preferencia por sustratos de ácidos grasos de cadena corta partiendo de una muestra de grasa butírica. Esta lipasa liberaba preferentemente ácido butírico (C4:0) y en menor medida ácido hexanóico (C6:0) (83). Como en este ensayo no se observó prevalencia por la liberación de ácidos grasos de cadena corta, es probable que las condiciones ambientales no sean las óptimas para la producción de esa enzima o su actividad.

9.2 Análisis de hibridación *in situ*

Diseño de sondas marcadas con fluoróforos para la técnica de FISH

El diseño de sondas se llevó a cabo con base en artículos donde se hubieran publicado secuencias específicas para la técnica de FISH para los microorganismos de interés. Estas secuencias fueron comparadas a través del algoritmo BLAST con las bases de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) así como en el Ribosomal Database Project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>) y en la página de Probase (<http://131.130.66.200/cgi-bin/probecheck/probecheck.pl>) con el fin de evaluar su especificidad. Cuando no hubo reportes de secuencias publicadas, el diseño se realizó por cuenta propia mediante alineamientos del ARNr 16S.

Sonda universal para bacterias

El oligo universal contiene una secuencia que permite hibridar con cualquier microorganismo perteneciente al dominio de las bacterias. La secuencia más utilizada se denomina EUB338 (63, 84, 72, 73, 74) cuya secuencia fue la siguiente:

5' – GCT GCC TCC CGT AGG AGT- 3'

La hibridación con esta sonda permitió visualizar en su totalidad a la población bacteriana, a partir de lo cual nos fue posible inferir a qué porcentaje de ésta correspondía cada género así como la fracción de la misma que no pertenecía a ninguno de los géneros establecidos.

Para este oligo el valor de expectancia (E) es de 0.870¹ de acuerdo al BLAST contra Genbank. Éste es relativamente alto, tal como se esperaba, pues la sonda debe ser capaz de hibridar con cualquier bacteria presente en la muestra.

Sonda para el género *Bacillus* spp.

En 2009, Porwal *et al.* publicaron secuencias específicas que forman parte del gen ribosomal 16S de *Bacillus*, que permiten la identificación incluso a nivel de especie (75). Estos oligos fueron de utilidad para el diseño de sondas para la técnica de hibridación *in situ* debido a su tamaño y especificidad. La sonda de interés hibridó con el ARNr de *B. subtilis* y *B. pumilus*:

5' – ACT TGT TCT TCC CTA ACA ACA GAG CTT TA - 3'

La especificidad de la sonda, evaluada a través del algoritmo BLAST, (NCBI), indica un 100% de identidad y valor $E = 1 \times 10^{-6}$ con varias especies de *Bacillus*, entre ellas: *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. endophyticus*, *B. amylolicuefaciens* y varios *Bacillus* sp. En la base de datos del RDP la sonda

¹ El valor de expectancia indica el cálculo estadístico que representa el número de alineamientos que podría esperarse ocurrieran únicamente al azar. Entre más bajo sea su valor, se considera menos probable que ocurra un alineamiento azaroso.

presenta identidad con un total de 8,041 firmicutes, de las cuales el 89% corresponde al género *Bacillus*. Entre las especies que se mencionan en la lista aparecen *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. pseudomegaterium*, *B. licheniformis*, *B. alcalophilus*, *B. fumarioli* y varios *Bacillus sp.*

El sitio de hibridación del primer nucleótido de la sonda Porwal corresponde a la posición 428 y hasta la 457 del gen ribosomal 16S de *E. coli*, que se encuentra en la región variable V3. En la Figura 9.2.1. se encuentran los resultados del análisis computacional en las diversas bases de datos.

Hits for (ACTTGTTCTCCCTACAACAGACTTA) 10 out of 9715 shown.

Name	Acc.	MM	WM	ΔG	Pos.	Compl.	Sequence
							UAAAGCUCUGUUGUAGGGAGAACAAGU
<i>Bacillus sp.</i>	AB017590	0		-31.30	428	1	UUCGGAUCG-----GCGUUCAA
<i>Bacillus subtilis</i>	AB018485	0		-31.30	428	1	UUCGGAUCG-----ACCGUUCGA
<i>Bacillus sp.</i>	AB020197	0		-31.30	428	1	UUCGGAUCG-----ACCGGAGGG
uncultured compost bacterium 4-11	AB034705	0		-31.30	428	1	UUCGGAUCG-----ACCGGAGUA
<i>Bacillus sp.</i> 135	AB043840	0		-31.30	428	1	UUCGGAUCG-----GCUAUUCAA
<i>Bacillus sp.</i> C-59-2	AB043848	0		-31.30	428	1	UUCGGAUCG-----GCUAUUCAA
<i>Bacillus sp.</i> Y	AB055095	0		-31.30	428	1	UUCGGGUCG-----GCGAGAGUA
<i>Bacillus sp.</i> CH20-1	AB055851	0		-31.30	428	1	UUCGGAUCG-----ACCGUUCGA
<i>Bacillus vietnamensis</i>	AB099708	0		-31.30	428	1	UUCGGAUCG-----GCGUUCGA
<i>Bacillus halmapalus</i>	AB111938	0		-31.30	428	1	UUCGGGUCG-----GCGAGAGUA

previous Page 1 of 972 next

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JN558839.1	Bacillus amyloliquefaciens strain MH18B1 16S ribosomal RNA gene, part	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JN596247.1	Bacillus sp. TMR1.17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JN596246.1	Bacillus sp. TMR1.6.2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JN596245.1	Bacillus sp. TMNR3.3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JN596244.1	Bacillus sp. TMNR2.7.2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JN596243.1	Bacillus sp. TMNR2.7.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JN247731.1	Bacillus subtilis strain RM 16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JF427781.1	Uncultured Bacillus sp. isolate DGGE gel band Kw3SB23 16S ribosomal	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JN412657.1	Bacillus amyloliquefaciens strain XF136 16S ribosomal RNA gene, partia	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JN411092.1	Bacillus amyloliquefaciens strain D29 16S ribosomal RNA gene, partial s	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JN411091.1	Bacillus sp. AM1(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JN411090.1	Bacillus sp. D16(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JN411089.1	Bacillus sp. H8(2011b) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JN409994.1	Bacillus pumilus strain NM03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JN573636.1	Uncultured bacterium clone EML11 16S ribosomal RNA gene, partial sec	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
JN566125.1	Bacillus pseudofirmus strain MC02 16S ribosomal RNA gene, partial sec	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
HQ651050.1	Bacillus pumilus strain CL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
HQ694309.1	Bacillus pumilus strain AIMST 1.B12.1 16S ribosomal RNA gene, partial	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
HQ694304.1	Bacillus pumilus strain AIMST 11.K24.1 16S ribosomal RNA gene, partia	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
HQ694303.1	Bacillus subtilis strain AIMST 10.T24.1 16S ribosomal RNA gene, partial	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
HQ694302.1	Bacillus pumilus strain AIMST 9.P24.1 16S ribosomal RNA gene, partial	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
CP002468.1	Bacillus subtilis BSn5, complete genome	58.0	579	100%	1e-06	100%
HQ588860.1	Bacillus sp. enrichment culture clone VBUM5 16S ribosomal RNA gene,	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
HQ588347.1	Bacillus subtilis strain KIBGE-IB17 16S ribosomal RNA gene, partial seq	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
HQ684010.1	Bacillus subtilis strain AIMST 1.Mi.16 16S ribosomal RNA gene, partial s	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
HQ683999.1	Bacillus vireti strain AIMST 3.Co.1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	58.0	58.0	100%	1e-06	100%
HQ683986.1	Bacillus flexus strain AIMST 1.Tc.1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	58.0	58.0	100%	1e-06	100%

Probe Match Result

[start over | help | options]

Display depth: Errors Allowed: Probe: 5' ACTTGTTCCTCCCTAACACACAGAGCTTTA 3'
Target: 5' TAAAGCTCTGTTGTTAGGGGARGAACRAAGT 3'

Lineage (click node to return it to hierarchy view):

Root (10965/1921179); Bacteria (10965/1847604); "Firmicutes" (10956/581405); "Bacilli" (10951/347373); Bacillales (10949/206482); Bacillaceae (10885/40013)

Hierarchy View:

▼ genus Bacillus (9947/29764) (hits/total searched) [list results for this node]

S000000213 Bacillus sp.; DSM 8724; X76448
S000000656 Bacillus sp. NCIB12289; AB055097
S000001146 Bacillus fumarioli; LMG 18418; AJ250059
S000001363 Bacillus subtilis subsp. subtilis; Lactipan; AJ277905
S000001559 Bacillus halmapalus (T); DSM 8723; X76447
* S000002098 Bacillus sp. BAC2; AF346491
S000002434 Bacillus sp. SD521; AB055096
S000002968 Bacillus sp.; TGS537; AB020196
S000003466 Bacillus fumarioli; LMG 17492; AJ250057
S000003473 Bacillus subtilis (T); DSM10; AJ276351
S000003772 Bacillus sp.; TGS650; AB020197
S000004057 Bacillus sp. TAT105; AB066342
S000004434 Bacillus sp. KSM-KP43; AB055093
S000005955 Bacillus sp. XE22-4-1; AF326122
S000006331 Bacillus sp. Y; AB055095
S000006847 Bacillus mojavensis (T); IFO15718; AB021191
S000007422 unidentified Hailaer soda lake bacterium F6; AF275705
S000007628 Bacillus carboniphilus (T); JCM9731; AB021182
S000008091 Bacillus alcalophilus (T); DSM 485 T; X76436
S000008094 uncultured eubacterium; 5-28; AJ222833

Fig. 9.2.1. Resultados del análisis del oligo Porwal para *Bacillus* spp., al ingresar la secuencia en las bases de datos de Probase, BLAST contra el Genbank y RDP respectivamente.

Sonda para el género *Enterococcus* spp.

El oligo específico para enterococos se diseñó en este trabajo a partir de alineamientos entre las secuencias del gen ribosomal 16S de *Enterococcus faecium* con *faecalis* (no se muestran los alineamientos). La secuencia obtenida fue la siguiente:

5' – AAA GAG GAG TGG CGA ACG GG - 3'

De acuerdo al BLAST contra el Genbank, esta sonda se alinea con secuencias específicas presentes en *Enterococcus mundtii* y *E. faecium*, así como varias bacterias no cultivables con 100% de identidad y E= 0.061.

El sitio de hibridación corresponde de la posición 93 a la 113 de la región variable V1 del gen ribosomal 16S en *E. coli*. Se presentan en la Figura 9.2.2. los resultados de búsqueda en cada una de las bases de datos.

Hits for (AAAGAGGAGTGGCGAACGGG) 10 out of 889 shown.

Name	Acc.	MM	WM	ΔG	Pos.	Compl.	Sequence
							AAAGAGGAGUGGCGAACGGG
Enterococcus saccharolyticus	AF061004	0		-24.90	93	0	UUCAUUGGA-----UGAGUAACA
Enterococcus saccharolyticus	AJ301839	0		-24.90	93	0	UUCAUUGGA-----UGAGUAACA
Enterococcus saccharolyticus	DQ411816	0		-24.90	93	0	UUCAUUGGA-----UGAGUAACA
uncultured bacterium	EU560789	0		-24.90	93	0	UUCAUCGGA-----UGAGUAACA
uncultured bacterium	EU560821	0		-24.90	93	0	UUCAUCGGA-----UGAGUAACA
uncultured bacterium	EU560859	0		-24.90	93	0	UUCAUCGAA-----UGAGUAACA
uncultured bacterium	EU560876	0		-24.90	93	0	UUCAUCGAA-----UGAGUAACA
uncultured bacterium	EU560768	0		-24.90	93	0	UUCAUCGGA-----UGAGUAACA
Enterococcus saccharolyticus	Y18357	0		-24.90	93	0	UUCAUUGGA-----UGAGUAACA
Enterococcus faecium DO	AAK03000004	0		-24.90	93	0	CCACCGGAA-----UGAGUAACA

previous Page 1 of 89 next

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JN257085.1	Enterococcus mundtii strain Ag5 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	40.1	40.1	100%	0.061	100%
NR_042054.1	Enterococcus faecium strain LMG 11423 16S ribosomal RNA, partial seq	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF680879.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01DBOZL 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF680027.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01B8UXN 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF679271.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01BBBQJ 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF678381.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01AJ89M 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF678354.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01EHRHS 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF678007.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01DNJHD 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF677744.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01B0T94 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF677592.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01A728H 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF676843.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01C9A2I 16S ribosomal RNA gene,	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF675602.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01DYPFC 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF675473.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01DVGJ5 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF675388.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01EUGQ7 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF675363.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01CCXQT 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF674385.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01BXFK9 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF674261.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01CPKNG 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF674223.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01B7KAW 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF673913.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01BY4RV 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF673070.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01CHGRE 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF672960.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01BBU2G 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF671268.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01E0ADW 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF670841.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01DS7A9 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF670634.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01CIH57 16S ribosomal RNA gene,	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF669627.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01E00WV 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF669131.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01EW75G 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%
JF668488.1	Uncultured bacterium clone GDIC2IK01B8SG9 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.061	100%

Probe Match Result

[start over | help | options]

Display depth: Errors Allowed: Probe: 5' CCGTTCGGCCACTCCTTT 3'
Target: 5' AAAGAGGAGTGGCGAACGGG 3'

Lineage (click node to return it to hierarchy view):

Root (1073/1921179); Bacteria (1073/1847604); "Firmicutes" (1072/581405); "Bacilli" (1068/347373); "Lactobacillales"
(1067/140326); "Enterococcaceae" (1065/7555)

Hierarchy View:

▼ genus *Enterococcus* (1057/6929) (hits/total searched) [list results for this node]

S000002717 *Enterococcus faecium* (T); LMG 11423; AJ301830
S000002718 *Enterococcus saccharolyticus*; NCDO 2594T; Y18357
S000005098 *Enterococcus pseudoavium*; LMG 11426; AJ301837
S000008500 *Enterococcus hirae*; DSM20160; AJ276356
S000008880 *Enterococcus saccharolyticus*; LMG 11427; AJ301839
S000009243 *Enterococcus canis* (T); LMG12316; X76177
S000009626 *Enterococcus mundtii*; NCFB 2375T; Y18340
S000010023 *Enterococcus faecium*; NCFB 942T; Y18294
S000011197 *Enterococcus faecium*; W149; AJ291731
S000011848 *Enterococcus faecium*; AF039901
S000011952 *Enterococcus faecium*; W1107; AJ291732
S000014252 *Enterococcus faecium*; DSM20477; AJ276355
S000015344 *Enterococcus hirae*; NCFB 1258T; Y18354
S000016049 *Enterococcus hirae*; LMG 6399; AJ301834
S000016413 *Enterococcus hirae* (T); DSM 20160; Y17302
S000030465 *Enterococcus mundtii*; TN11556; AF241576
S000092870 *Enterococcus faecium*; 3D; AJ490513
S000092872 *Enterococcus faecium*; 8B; AJ490519
S000092873 *Enterococcus faecium*; 8G; AJ490521
S000096880 *Enterococcus faecium*; 8C; AJ490520

Fig. 9.2.2. Resultados del análisis del oligo Escent contra *Enterococcus* spp. al ingresar la secuencia en las bases de datos de Probase, BLAST contra el Genbank y RDP respectivamente

Sonda para el género *Staphylococcus* spp.

Para la identificación de *Staphylococcus* a nivel de género no se encontró reporte en la bibliografía, por lo que fue necesario llevar a cabo el diseño de la sonda. Para esto, se realizó el alineamiento de las secuencias del gen 16S de las especies de *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. saprophyticus* y *S. piscifermentans* (no se muestran los alineamientos). De este modo fue posible identificar secuencias en común a partir de las cuales se realizaron ensayos en las bases de datos para evaluar especificidad, en cuyo análisis fue importante que la sonda no hibridara con *S. aureus*, pues al tratarse de un patógeno, su búsqueda se realizará por separado en otro trabajo.

La secuencia con los mejores resultados fue la siguiente:

5' – GGT GAG TAA CAC GTG GGT AAC CTA CCT ATA – 3'

Los resultados del BLAST contra Genbank indican que este oligo se alinea con un 100% de identidad y un valor $E=3 \times 10^{-7}$ con secuencias del gen ribosomal 16S de las siguientes especies de *Staphylococcus*: *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. sciuri*, *S. equorum* y *S. haemolyticus* entre otros estafilococos. En la base de datos del RDP se obtuvo alineamiento con 10,590 estafilococos, entre los cuales se encuentran *S. carnosus*, *S. saprophyticus*, *S. piscifermentans*,

S. lutrae, *S. hominis*, *S. condimentii*, *S. xylosus* y *S. simulans* entre otros. Lo importante es que ninguna de las bases de datos arroja *S. aureus* como resultado.

La sonda Escsta tiene su sitio de hibridación de la posición 111 a la 141 del gen ribosomal 16S de *E. coli* en la región variable V1. Se presentan los resultados del análisis computacional en la Figura 9.2.3.

Hits for (GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCATA) 10 out of 4159 shown.

Name	Acc.	MM	WM	ΔG	Pos.	Compl.	Sequence
							GGUGAGUAACACGUGGGUAACCUACCUAUA
<i>Staphylococcus piscifermentans</i>	S G E AB009943	0		-33.62	111	0	CGGCGGACG-----AGACUGGAA
<i>Staphylococcus equorum</i> subsp.	S G E AB009939	0		-33.62	111	0	CGGCGGACG-----AGACUGGAA
<i>Staphylococcus</i> sp. J33	S G E AB167056	0		-33.62	111	0	CGGCGGACG-----AGACUGGAA
<i>Staphylococcus arlettae</i>	S G E AB009933	0		-33.62	111	0	CGGCGGACG-----AGACUGGAA
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	S G E AB009941	0		-33.62	111	0	CGGCGGACG-----AGACUGGGA
<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. u	S G E AB009936	0		-33.62	111	0	CGGCGGACG-----AGACUGGAA
<i>Staphylococcus kloosii</i>	S G E AB009940	0		-33.62	111	0	CGGCGGACG-----AGACUGGAA
<i>Staphylococcus carnosus</i> subsp.	S G E AB009934	0		-33.62	111	0	CGGCGGACG-----AGACUGGAA
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	S G E AB009942	0		-33.62	111	0	CGGCGGACG-----AGACUGGGA
unidentified bacterium	S G E AB004765	0		-33.62	111	0	CGGCGGACG-----AGACUGGGA

[previous](#) | Page **1** | of 416 | [next](#)

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HM026222.1	<i>Staphylococcus</i> sp. MJB34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
AB662963.1	<i>Staphylococcus</i> sp. NCCP-197 gene for 16S rRNA, partial sequence	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
AB662960.1	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> gene for 16S rRNA, partial sequence	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
JN257097.1	<i>Staphylococcus</i> sp. Ag7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
JN230423.1	<i>Staphylococcus</i> sp. KMSZP2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
NR_041328.1	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i> strain GTC 844 16S ribosomal	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
NR_041327.1	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i> strain GTC 1227 16S ribosomal	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
NR_041326.1	<i>Staphylococcus fleurettii</i> strain GTC 1999 16S ribosomal RNA, partial s	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
NR_041324.1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> strain GTC 843 16S riboso	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
HQ323432.1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain A20 16S ribosomal RNA gene, pai	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
HQ690108.1	<i>Staphylococcus</i> sp. 10/63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
HQ204326.1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> strain M56 16S ribosomal RNA gene, part	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
HQ604913.1	<i>Staphylococcus arlettae</i> strain RS83 16S ribosomal RNA gene, partial s	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
FR719730.1	<i>Micrococcus</i> sp. 84MP partial 16S rRNA gene, strain 84MP, clone 12	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
FR719726.1	<i>Micrococcus</i> sp. 82MP partial 16S rRNA gene, strain 82MP, clone 8	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
FR719723.1	<i>Staphylococcus</i> sp. A7 partial 16S rRNA gene, strain A7, clone 5	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
FR719722.1	<i>Micrococcus</i> sp. 67MP partial 16S rRNA gene, strain 67MP, clone 4	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
HQ699551.1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> strain 1E 16S ribosomal RNA gene, partia	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
HQ728328.1	<i>Staphylococcus</i> sp. SXVI4(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
CP002439.1	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> HKU10-03, complete genome	60.0	359	100%	3e-07	100%
HQ641334.1	<i>Staphylococcus cohnii</i> strain BDA10 16S ribosomal RNA gene, partial s	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
GU361680.1	<i>Staphylococcus</i> sp. b40B(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
GU361679.1	<i>Staphylococcus</i> sp. b2A(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
HQ450216.1	<i>Staphylococcus delphini</i> strain GS-104 16S ribosomal RNA gene, partia	60.0	60.0	100%	3e-07	100%
HQ450215.1	<i>Staphylococcus delphini</i> strain GS-57 16S ribosomal RNA gene, partial	60.0	60.0	100%	3e-07	100%

Probe Match Result

[start over | help | options]

Display depth: Errors Allowed: Probe: 5' TATAGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCACC 3'
Target: 5' GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATA 3'

Lineage (click node to return it to hierarchy view):

Root (36751/1921179) ; Bacteria (36751/1847604) ; "Firmicutes" (36743/581405) ; "Bacilli" (36738/347373) ; Bacillales (36689/206482) ; "Staphylococcaceae" (36672/153351)

Hierarchy View:

▼ genus *Staphylococcus* (36280/143312) (hits/total searched) [list results for this node]

- * S000000262 *Staphylococcus* sp.; 05-41; X86633
- S000008953 *Staphylococcus lutrae* (T); X84731
- S000010870 *Staphylococcus haemolyticus* (T); CCM2737; X66100
- S000011120 psychrophilic marine bacterium PS35; AF200217
- S000013394 *Bacillus* sp. OS192; AJ251723
- S000013943 *Staphylococcus* sp.; 1F-23; X86640
- S000014058 *Staphylococcus sciuri* (T); DSM 20345T; AJ421446
- S000016099 *Staphylococcus hominis* (T); DSM 20328; X66101
- S000016103 *Staphylococcus* sp.; AG-30; X86641
- S000016678 *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*; NT75; L20250
- S000021378 *Staphylococcus* sp.; S5-96; X86650
- S000022936 *Staphylococcus* sp.; 1F-22; X86639
- S000024954 *Staphylococcus* sp.; S2-12; X86644
- S000024957 *Staphylococcus* sp.; S5-95; X86649
- S000024958 *Staphylococcus* sp.; S5-91; X86645
- * S000026006 *Staphylococcus* sp.; S5-92; X86646
- S000026168 *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri*; NCTC 12103; Z26901
- S000026174 *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii*; DSM 20261; Z26893
- S000026176 *Staphylococcus equorum* subsp. *equorum*; DSM 20674; Z26895
- S000026182 *Staphylococcus caprae*; CCM 3573; Z26890

Fig. 9.2.3. Resultados del análisis del oligo Escsta contra *Staphylococcus* spp. al ingresar la secuencia en las bases de datos de Probase, BLAST contra el Genbank y RDP respectivamente.

En la Tabla 9.2.1 se resume la información de los oligonucleótidos utilizados como sondas. Todas fueron sintetizadas y marcadas en el extremo 5' con los fluoróforos de la Tabla 9.2.2 por Applied Biosystems.

Tabla 9.2.1. Resumen de las características de hibridación de cada sonda.

Microorganismo	Nombre	Secuencia 5'→3'	Posición* /RV	Referencia
Bacteria	EUB338	NED-GCTGCCTCCCGTAGGAGT	337/RPV	(63,84,90,91,92)
<i>Enterococcus spp.</i>	Escent	PET-AAAGAGGAGTGGCGAACGGG	93/V1	Este trabajo
<i>Staphylococcus spp</i>	Escsta	6FAM-GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATA	111/V1	Este trabajo
<i>Bacillus spp.</i>	Porwal	PET-ACTTGTCTTCCCTAACCAACAGAGCTTTA	428/V3	(93)

* Posición de hibridación del primer nucleótido de la sonda en el gen ribosomal 16S de *E. coli*, RV: región variable, RPV: región poco variable.

La longitud de onda de máxima excitación de todos los fluoróforos se encuentra dentro del intervalo al que el láser del microscopio confocal es capaz de trabajar y que va de 405-640 nm. Para la visualización de todas las preparaciones se utilizó un microscopio confocal Olympus FV10-ASW.

Se determinó experimentalmente la longitud de onda de máxima emisión en todos los casos con el fin de optimizar la captación de señal (Tabla 9.2.2). Las diferencias entre los valores teórico y experimental pueden deberse al medio en el que se encuentra el fluoróforo, que en este caso en buffer TE. Los espectros se encuentran en la sección 8.14 de las metodologías.

Tabla 9.2.2. Características de los fluoróforos disponibles por Applied Biosystem.

Fluoróforo	λ excitación	λ emisión teo	λ emisión exp
6-FAM	494	523	515
NED	546	575	575
PET	558	595	580

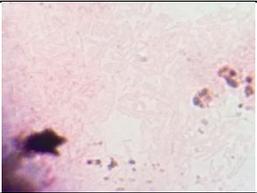
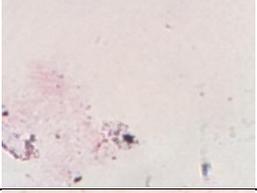
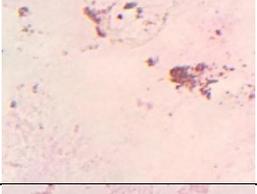
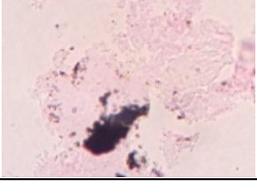
Pruebas de permeabilización

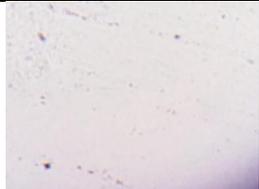
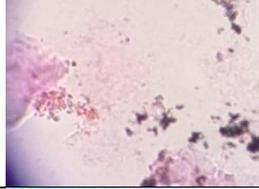
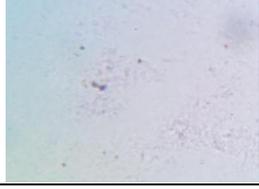
Algunos reportes en los que se ha realizado FISH sobre microorganismos Gram positivos, por lo general se reporta tratamiento con lisozima y/o proteinasa k así como el establecimiento experimental de condiciones óptimas con el fin de garantizar que la sonda marcada se introduzca en la célula y pueda ponerse en contacto con la secuencia blanco, mientras que cuando se ha reportado esta misma técnica con Gram negativos se omite de tratamiento enzimático.

Las cepas puras fueron expuestas a distintas concentraciones de lisozima y de proteinasa K para identificar las condiciones óptimas que permitieran la entrada del oligo sin pérdida de la morfología. Se trabajó con *B. pumilus*, *E. faecalis* y *S. psifermentans*, todas ellas aisladas de queso Cotija. Resultados en Tablas 9.2.3 a 9.2.5, respectivamente.

Las preparaciones fueron teñidas con safranina para facilitar la visualización de las células y como auxiliar en la evaluación de la integridad de la pared celular.

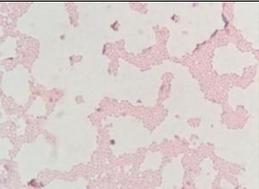
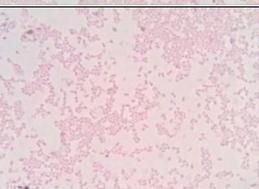
Tabla 9.2.3. Resultados pruebas de permeabilización para *B. pumilus*.

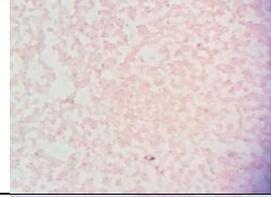
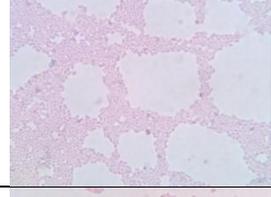
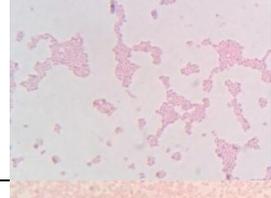
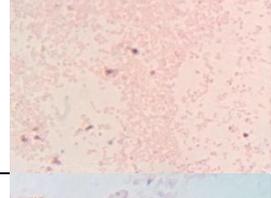
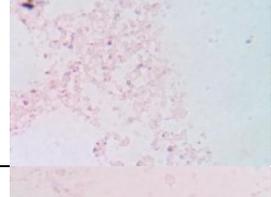
Lisozima (mg/mL)	Proteinasa K (mg/mL)	Fotografía	Observaciones
0.1	1		Se mantiene la morfología intacta. Buena tinción.
0.1	5		Prácticamente no se observan células, sólo algunos fragmentos de ellas. Prácticamente sin teñir.
0.1	10		Pérdida de morfología celular. Se aprecian fragmentos celulares en la preparación. Ligera tinción
0.5	1		Pérdida total de la morfología. Se observan fragmentos celulares en la preparación bien teñidos.

0.5	5		Casi imposible identificar células en la preparación.
0.5	10		Prácticamente no se observan células. Muy mala tinción.
1.0	1		Pérdida total de morfología celular. Se observan pocos fragmentos celulares. Prácticamente sin teñir.
1.0	5		Pérdida total de la morfología. Se observan fragmentos celulares ligeramente teñidos.
1.0	10		Pérdida total de morfología. Se observan fragmentos celulares dispersos. Prácticamente sin teñir.

Para este microorganismo las condiciones óptimas resultaron ser las menos drásticas y en las que se mantuvo la morfología sin dañar, ya que el resto de las combinaciones fueron demasiado agresivas. Las condiciones óptimas son 0.1 mg/mL de lisozima y 1 mg/mL de proteinasa K.

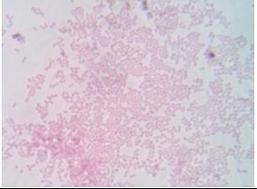
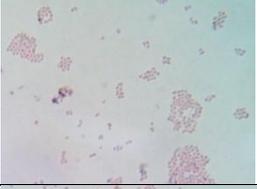
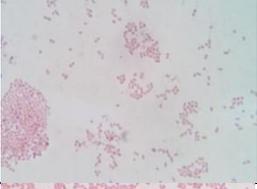
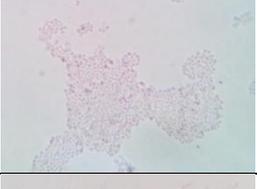
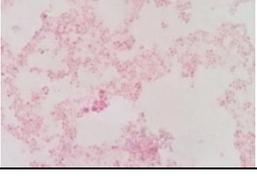
Tabla 9.2.4. Resultados pruebas de permeabilización para *E. faecalis*.

Lisozima (mg/mL)	Proteinasa K (mg/mL)	Fotografía	Observaciones
1	1		Morfología intacta. Muy buena tinción.
1	5		Morfología intacta. Muy buena tinción.

1	10		Morfología intacta. Muy buena tinción.
5	1		Morfología intacta. Buena tinción.
5	5		Morfología intacta. Buena tinción.
5	10		Morfología intacta. Buena tinción.
10	1		Pérdida severa de morfología. Tinción deficiente.
10	5		Pérdida severa de morfología. Se observan algunas células rotas. Tinción deficiente.
10	10		Pérdida severa de la morfología. Bordes muy difusos. Tinción deficiente.

En todos los casos en que *E. faecalis* fue tratado con 10 mg/mL de lisozima, las células sufrieron fuerte daño, pero cuando se trataron con 5 mg/mL de lisozima éstas siempre se mantuvieron intactas. Se eligió el tratamiento con 5 mg/mL de lisozima con la concentración más alta de proteinasa K (10 mg/mL).

Tabla 9.2.5. Resultados pruebas de permeabilización para *S. psifermentans*.

Lisozima (mg/mL)	Proteinasa K (mg/mL)	Fotografía	Observaciones
0.1	1		Morfología intacta. Muy buena tinción.
0.1	5		Morfología intacta. Buena tinción.
0.1	10		Morfología intacta. Buena tinción.
0.5	1		Morfología intacta. Muy buena tinción.
0.5	5		Morfología intacta. La tinción comienza a ser deficiente.
0.5	10		Morfología ligeramente dañada. Se aprecian algunas células rotas. Tinción deficiente.
1.0	1		Células claramente dañadas. Tinción muy deficiente.
1.0	5		Pérdida total de morfología. Buena tinción.

1.0	10		Pérdida total de morfología. Buena tinción.
-----	----	---	---

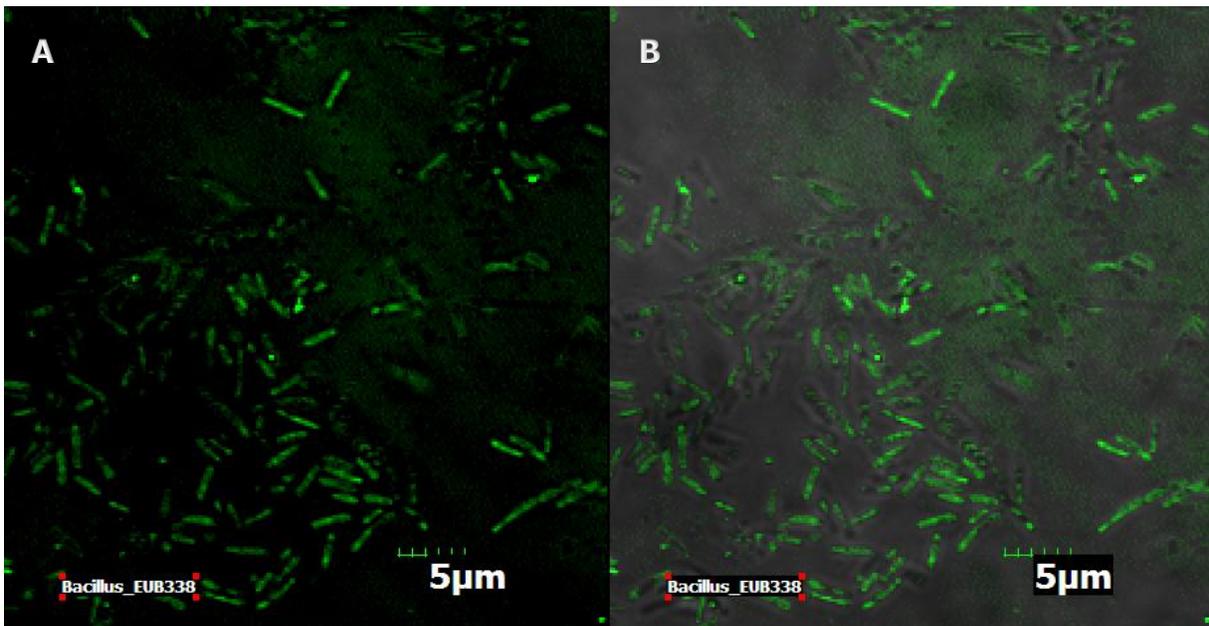
Este microorganismo conserva su estructura cuando se mantiene la concentración de lisozima por debajo de 0.5 mg/mL, por lo que se combinó con 1 mg/mL de proteinasa K.

Las condiciones de tratamiento enzimático óptimo para cada microorganismo (Tabla 9.2.6) nos imposibilitó el hacer hibridaciones simultáneas debido a que cada microorganismo requirió condiciones distintas de permeabilización.

Tabla 9.2.6. Tratamientos enzimáticos óptimos para cepas puras.

Microorganismo	Lisozima (mg/mL)	Proteinasa K (mg/mL)
<i>B. pumilus</i>	0.1	1
<i>E. faecalis</i>	5.0	10
<i>S. psifermentans</i>	0.5	1

Se muestra en las siguientes imágenes (Figura 9.2.4.) la entrada de la sonda universal en las células gracias a la eficiencia del tratamiento enzimático en el paso de permeabilización.



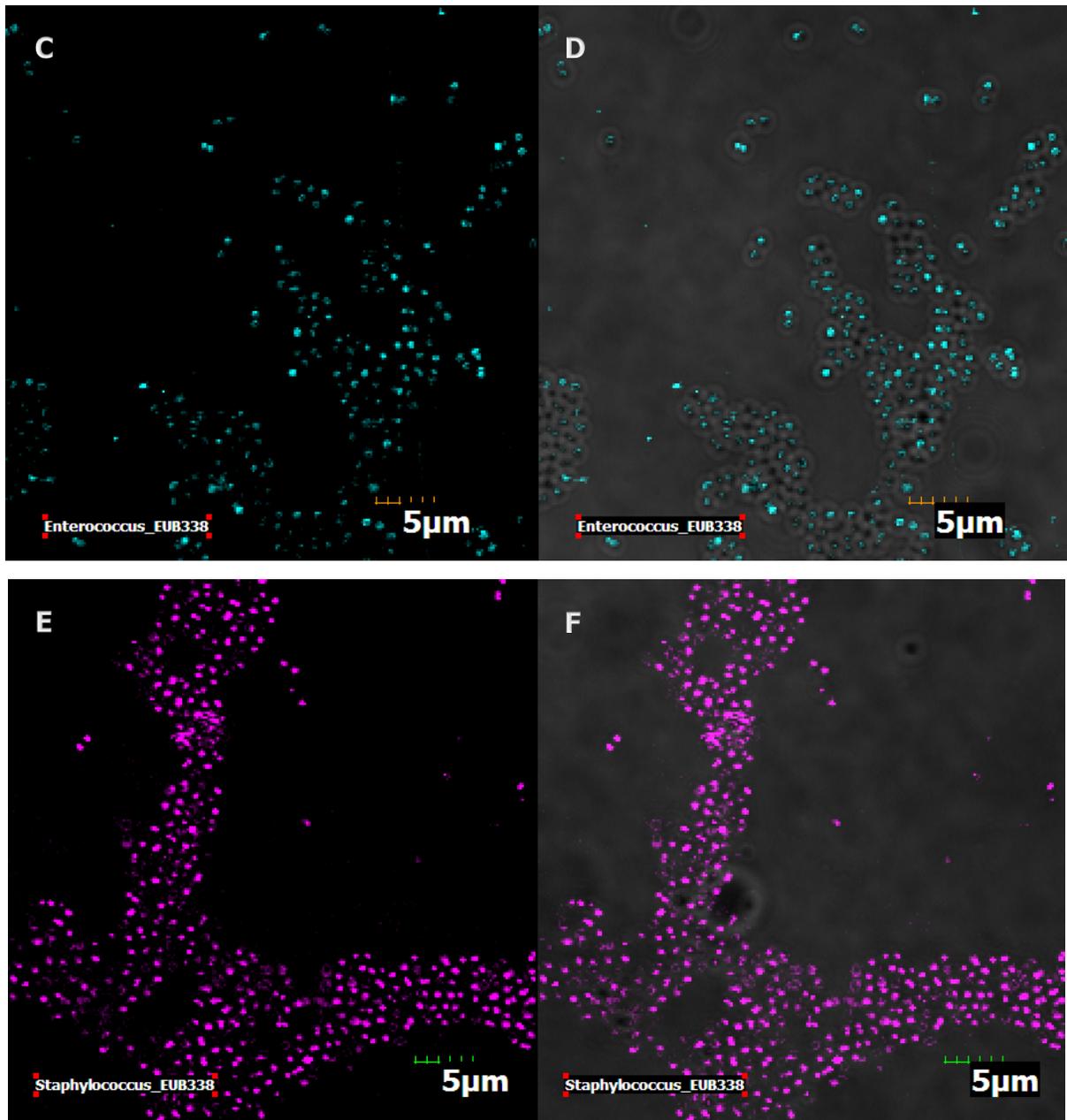


Fig.9.2.4. Hibridación de cepas puras contra sonda universal. Paneles A y B, *Bacillus pumilus* contra EUB338 campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles C y D, *Enterococcus faecalis* contra EUB338 campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles E y F, *Staphylococcus psifermentans* contra EUB338 campo oscuro y campo claro respectivamente.

Optimización de las condiciones de hibridación

Una vez determinadas las condiciones de permeabilización se establecieron experimentalmente las de hibridación, probando diferentes grados de astringencia en el buffer así como tiempos de lavado.

Se probaron tres concentraciones de formamida distintas: 0, 10 y 25% (v/v), y dos condiciones de lavado a 42°C, durante 10 ó 5 minutos en buffer de lavado (20 mM de Tris-HCl (pH 7.2), 0.01% (p/v) SDS, 40 mM de NaCl y 5 mM de EDTA), de acuerdo a las referencias consultadas.

En todos los casos la señal de las sondas específicas se perdió por completo cuando la preparación fue sometida a lavado. Sólo la sonda universal mantuvo la señal fluorescente a todas las concentraciones de formamida, con y sin lavado. Es decir, que una vez que ocurre el apareamiento de bases entre el ARNr de la célula y el oligo, el apareamiento con las sondas específicas es tan débil que ésta se resuspende en el buffer de lavado aunque el enjuague se realice por poco tiempo.

Por esta razón el paso de lavado fue excluido de la metodología y después de la incubación, se llevó a cabo un solo paso de enjuague con agua destilada antes de la visualización.

Se realizaron ensayos para determinar la especificidad de los oligos, donde células de cultivos puros se hibridaron contra las sondas diseñadas para los géneros *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Bacillus*. En todos los casos se comprobó la inexistencia de hibridaciones cruzadas entre los géneros (Ver Anexo 8). En la Tabla 9.2.7 se muestran las condiciones evaluadas y en negritas se destaca la óptima, que corresponde a la señal positiva para el microorganismo blanco y es siempre negativa para el resto. Se tomaron de tres a cuatro campos independientes que corresponden a cada signo en la tabla.

Tabla 9.2.7. Resultados de condiciones de hibridación evaluadas.

Microorganismo	Escent	Escsta	Porwal	EUB338	Condiciones	
<i>Enterococcus</i>	--- (-)	ND	ND	+++ (+)	25%F, S/L	
	+++ (+)	--- (-)	--- (-)	+++ (+)	10%F, S/L	
	+- (-)	--SI (-)	--- (-)	+++ (+)	0%F	S/L
	--- (-)	SI+- (-)	--- (-)	+++ (+)		10 min
	--- (-)	SI-- (-)	--- (-)	+++ (+)		20 min
<i>Staphylococcus</i>	ND	+++ (+)	ND	+++ (+)	25%F, S/L	
	--- (-)	-- (-)	--- (-)	++ (+)	10%F, S/L	
	--- (-)	SI- (-)	--- (-)	++ (+)	0%F	S/L
	--SI (-)	SI-SI (-)	--- (-)	+++ (+)		10 min
	--- (-)	-- (-)	--- (-)	+++ (+)		20 min
<i>Bacillus</i>	--- (-)	--- (-)	--- (-)	+++ (+)	25%F, S/L	
	--- (-)	--- (-)	--+ (-)	+++ (+)	10%F, S/L	
	--- (-)	--- (-)	+++ (+)	+++ (+)	0%F	S/L
	SI (-)	---- (-)	--- (-)	+++ (+)		10 min
	--- (-)	--- (-)	--- (-)	+++ (+)		20 min

- Negativo, + Positivo, SI Señal inespecífica, () Conclusión, ND No Determinado, S/L sin lavado, F concentración de formamida en % v/v.

La formamida es un agente desnaturalizante cuyo papel en el buffer de hibridación es el de desestabilizar apareamientos de cualquier tipo, es decir, afecta tanto a los dúplex formados entre los oligos, como a estructuras secundarias dentro de los mismos, así como a las horquillas características dentro del ARNr y a la formación de los híbridos, disminuyendo la T_m (temperatura de fusión).

A mayor concentración de formamida en el buffer, el efecto astringente o desestabilizador en el híbrido será más notorio cuando el tamaño del oligo así como su contenido de GC disminuyan.

Un valor termodinámico útil que se puede interpretar como una medida de la estabilidad es el ΔG° (o energía libre), mientras más negativo es el valor, más estable es el dúplex.

Se realizó un análisis *in silico* sobre la probabilidad de formación de estructuras secundarias en las sondas que pudiera interferir en la hibridación, esto con ayuda del programa Oligo7 (2010) (ver Tabla 9.2.8.).

Tabla 9.2.8. Análisis de estabilidad de los híbridos y estructuras secundarias.

Sonda	T_m (°C) ¹	ΔG (kcal/mol) ²	GC (%)	Formamida (%) ³	Tamaño (nt)	ΔG° (kcal/mol) ⁴
Escsta	62.3	-33.6	46.6	25	30	-8.5
Escent	59.1	-24.9	60.0	10	20	-2.5
Porwal	58.9	-31.3	37.9	0	29	-6.3
EUB338	60.8	-22.8	67.0	10	18	-5.6

1. El cálculo de T_m se basa en la fórmula de *Nearest-Neighbor* con concentración de NaCl 50 mM y concentración de hebra sencilla de 250 pM. Calculado mediante el programa computacional Oligo7 (Versión 7, 2010).

2. El valor de ΔG referente a la estabilidad del dúplex sonda-ARNr, fue calculado a una concentración de NaCl 1M y a la temperatura de hibridación de trabajo (42°C) mediante probeCheck, del sitio ProbeBase disponible por <http://131.130.66.200/cgi-bin/probecheck/probecheck.pl>.

3. Concentración óptima de formamida determinada experimentalmente.

4. ΔG° correspondiente al dúplex más estable que se forma entre oligos con la misma secuencia calculado en condiciones de concentración de NaCl 1M, a 25°C y pH 7. Datos calculados por el programa computacional Oligo7.

En la Figura 9.2.5. se presentan los resultados del análisis de la sonda específica para estafilococos (Escsta). Ésta es la que presenta la mayor cantidad de estructuras secundarias internas probables, tres de ellas con valores de ΔG° negativos y dos más con valores positivos, es decir, es poco probable que estas últimas se formen espontáneamente; y dos estructuras dúplex que comprometen 7 puentes de hidrógeno, ambas con valores de ΔG° de -8.5 kcal/mol. Esto explica en parte que sea necesaria una alta concentración de formamida en el buffer que permita linealizar la sonda.

Por otro lado, es también la que presenta el ΔG de hibridación más negativo de todos, lo que se traduce en alta estabilidad del híbrido, lo que le permite soportar condiciones de alta astringencia de hibridación. Todo lo anterior se relaciona positivamente con las condiciones óptimas de concentración de formamida necesarias en el buffer de hibridación.

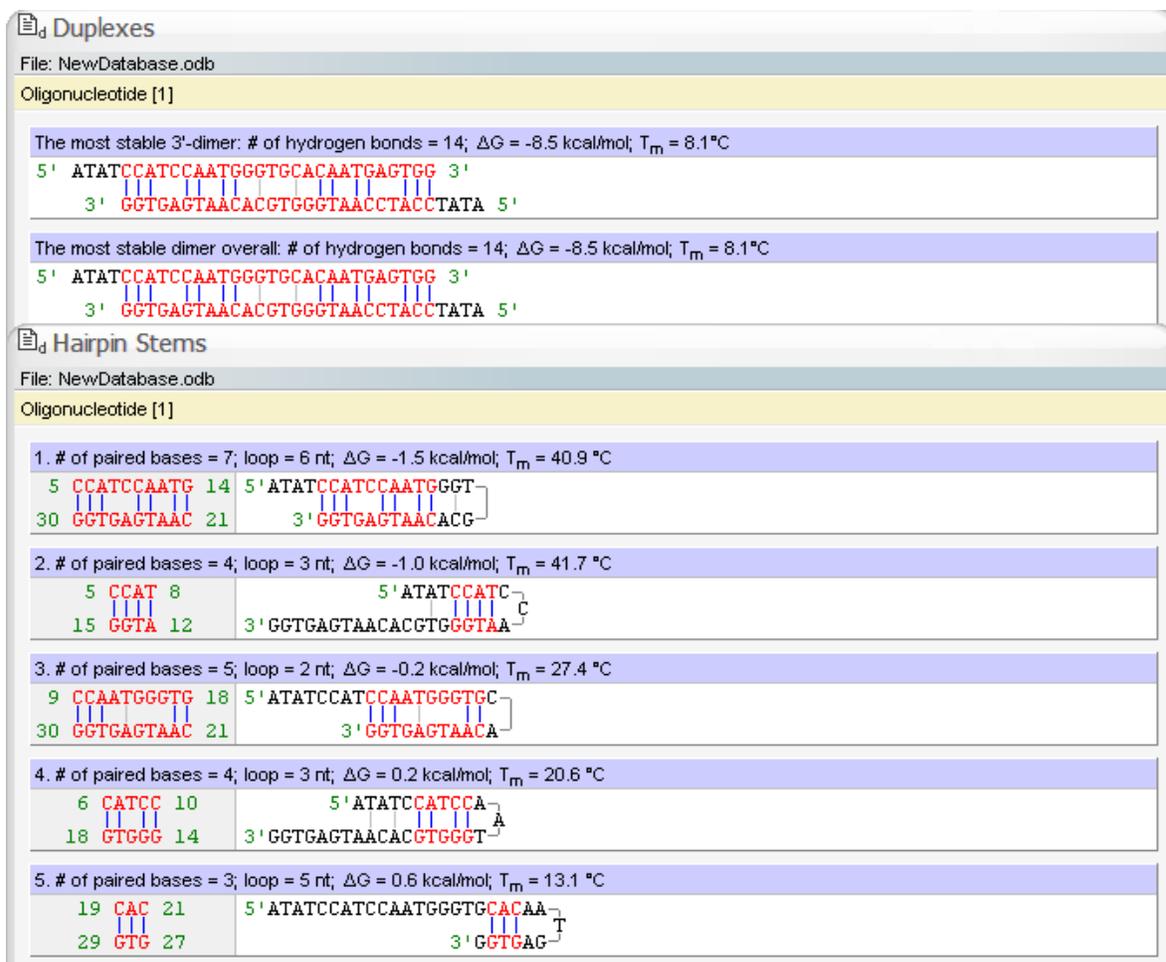


Fig. 9.2.5. Estructuras secundarias y dúplex de acuerdo al programa Oligo7 para la sonda Escsta.

La sonda específica para enterococos es la única que no presenta estructuras secundarias estables y es capaz de formar sólo un dúplex estabilizado únicamente con cuatro puentes de hidrógeno ($\Delta G^0 = -2.5$ kcal/mol), tal como lo muestra la Figura 9.2.6.

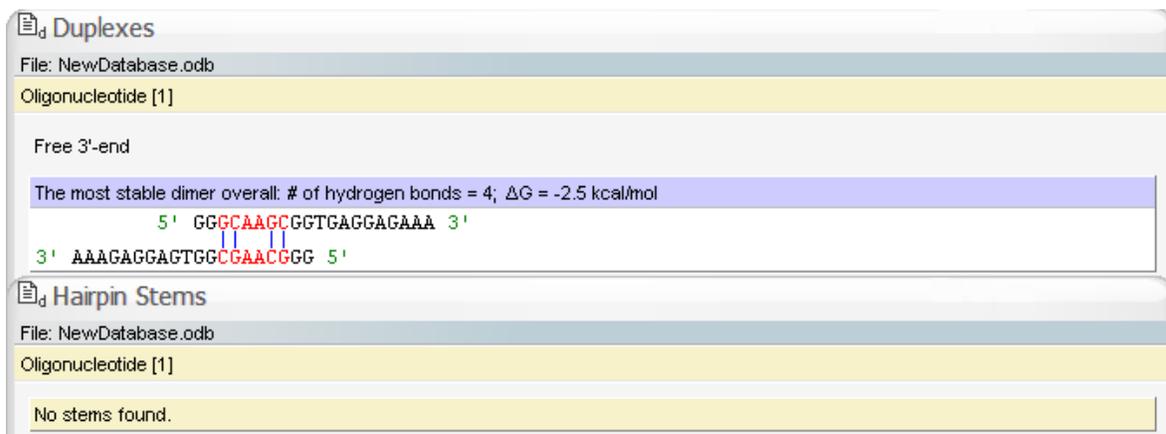


Fig. 9.2.6. Estructuras secundarias y dúplex de acuerdo al programa Oligo7 para la sonda Escsent.

Escnt posee además un ΔG de hibridación menor al de la sonda Escsta pero muy parecido al de la sonda universal. Con este oligo se obtiene buena señal a concentración de formamida del 10%.

El oligo marcado para identificar a *Bacillus* spp., así como la sonda universal para bacterias, pueden formar cada uno dos estructuras de horquilla y dos estructuras dúplex.

Tal como lo muestra la Figura 9.2.7., se esperaría una concentración de formamida relativamente alta para llevar a cabo la desestabilización de los dúplex que se forman espontáneamente con la sonda Porwal, cuya estructura más estable tiene un $\Delta G^{\circ} = -6.3$ kcal/mol, además de que el valor de ΔG de hibridación es el segundo más alto, sin embargo, en presencia de formamida, la señal siempre fue nula.

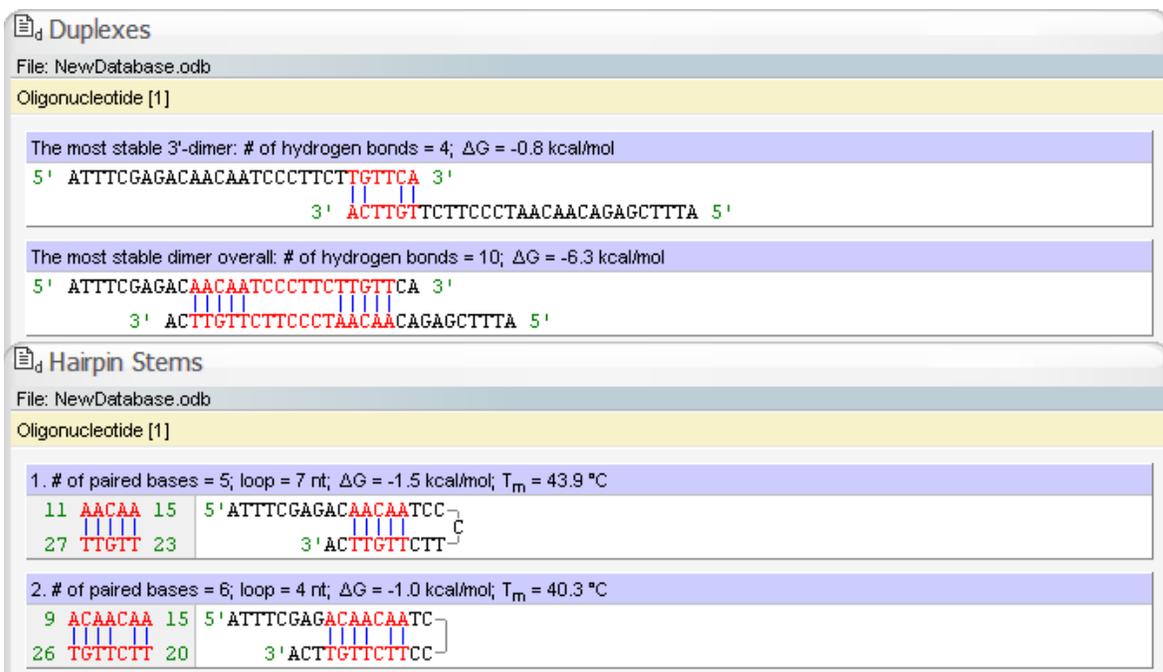


Fig. 9.2.7. Estructuras secundarias y dúplex de acuerdo al programa Oligo7 para la sonda Porwal.

En cambio, la sonda universal cuyas estructuras secundarias y de dúplex son más fáciles de desestabilizar con respecto a las que forma la sonda Porwal, ($\Delta G^{\circ} = -5.6$ kcal/mol), y cuyo valor de ΔG de hibridación es el menos negativo, siempre dio señal positiva en ausencia de formamida y aún a las concentraciones más altas del agente desnaturizante.

La Figura 9.2.8. corresponde a las estructuras secundarias que la sonda universal es capaz de formar consigo misma.

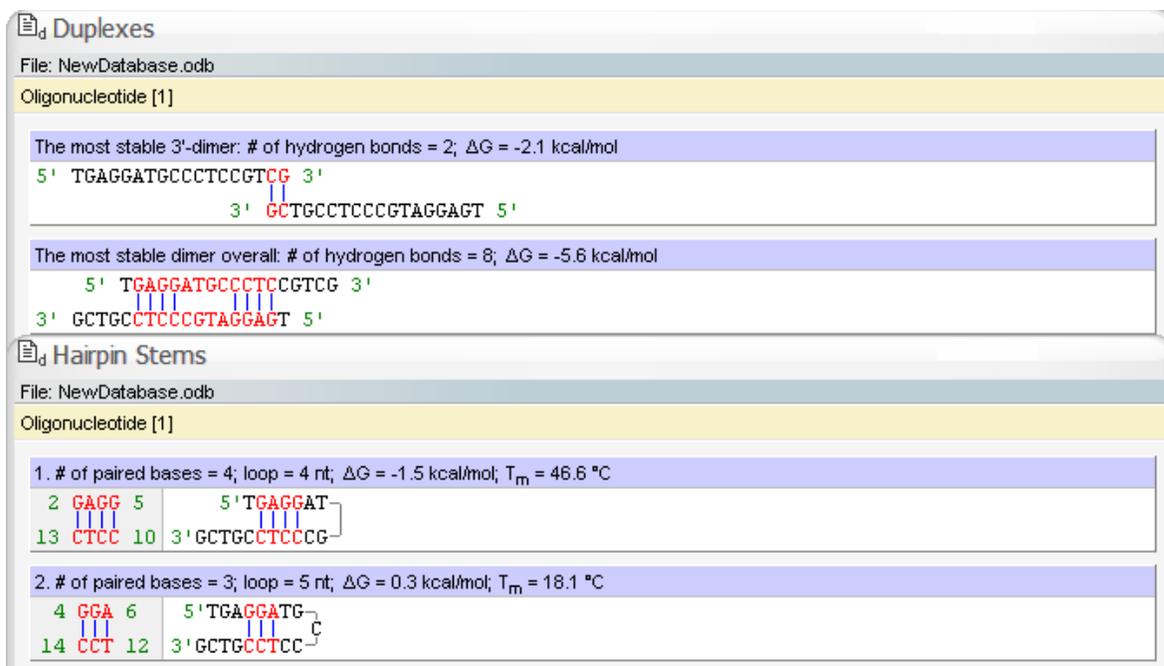


Fig. 9.2.8. Estructuras secundarias y dúplex de acuerdo al programa Oligo7 para la sonda EUB338.

Además de las dificultades que representa para la técnica la formación de orquillas y dúplex dentro del oligo, otro obstáculo en la unión de la sonda puede deberse a la estructura secundaria del ribosoma, que incluye interacciones ARNr-ARNr, así como las interacciones de las proteínas ribosomales con el ARNr. Fuchs, (76) realizó un análisis sobre la disponibilidad de hibridación de varias regiones del ARNr considerando la accesibilidad a las diferentes regiones.

Desafortunadamente, las regiones de más difícil acceso abarcan algunos de los sitios de mayor variabilidad del ARNr 16S, que son de gran importancia en el diseño de las sondas por su especificidad (76). Como ya se mencionó, la formamida es un agente desnaturizante que afecta también a la estructura secundaria del ARNr, por lo que es un factor importante en la exposición de los sitios de hibridación. En la Tabla 9.2.9 se presenta la ubicación de las sondas que se utilizaron en este trabajo, de acuerdo a la clasificación de los sitios de unión al gen ribosomal 16S según Fuchs (Ver Anexo 6).

Tabla 9.2.9. Análisis de estabilidad de los híbridos.

Sonda	Color*	Clasificación	% Formamida
Escsta	Amarillo	Clase III: 41-60%	25
Escent	Naranja	Clase II: 61-80%	10
Porwal	Verde	Clase IV: 21-40%	0
EUB338	Naranja	Clase II: 61-80%	10

*Ver Anexo 6.

El color corresponde a diferente clasificación de nivel de señal de acuerdo a la "brillantes" en una escala que se divide en seis clases (Clase I 81-100%; Clase II 61-80%; Clase III 41-60%; Clase IV 21-40%; Clase V 6-20%; Clase VI 0-5%), relativa al máximo observado con la sonda

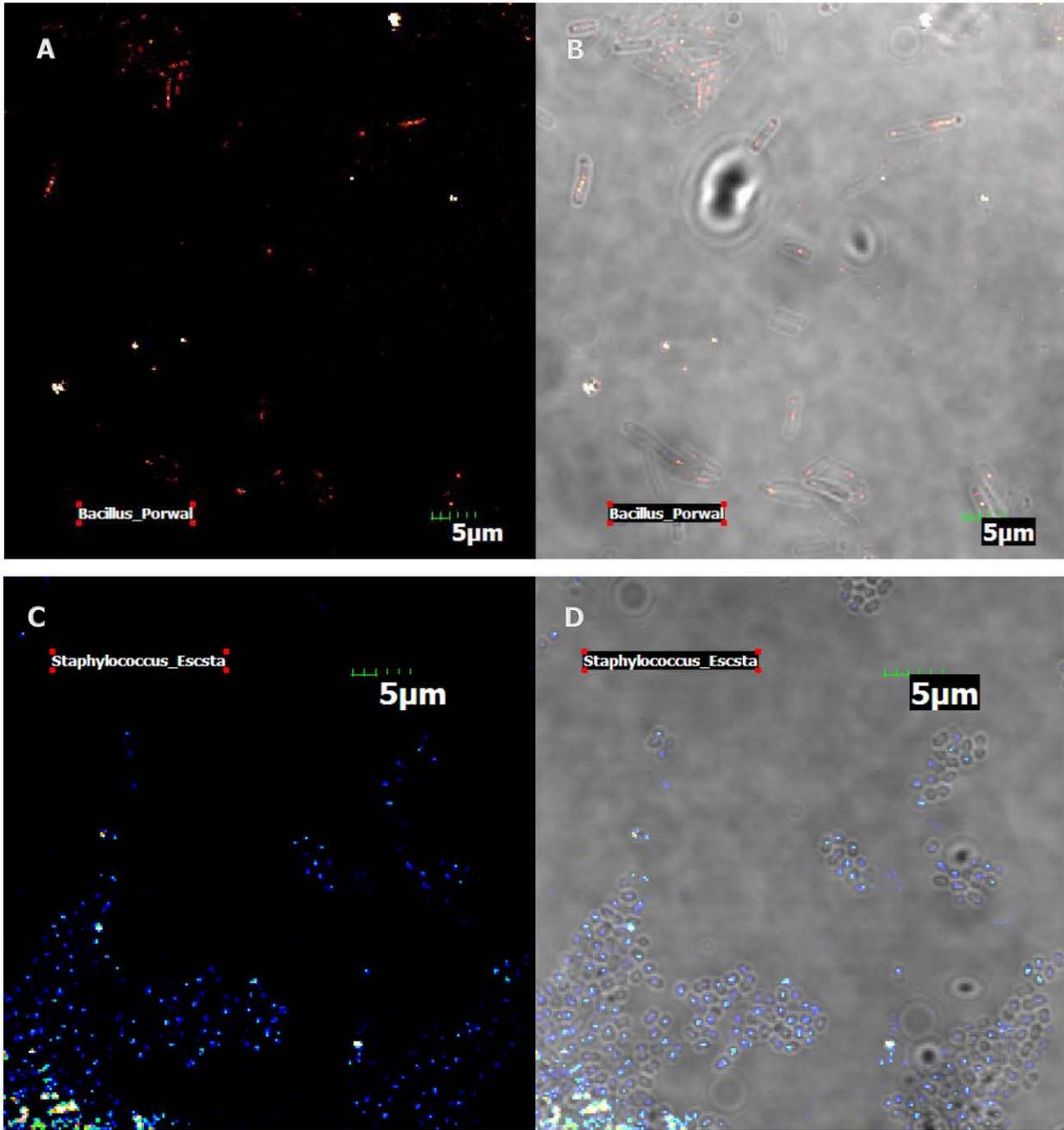
que presentó mejor señal en ese trabajo y que se relaciona directamente con la probabilidad de que el oligo encuentre su sitio blanco de hibridación.

De acuerdo a esta clasificación, las sondas cuyo sitio blanco se encuentra en regiones de más fácil acceso son las de clase II, Escnt (para *Enterococcus* spp.) y EUB338, que son también las que tienen mayor contenido de GC (60 y 67% respectivamente), lo que permite que el híbrido formado entre la sonda y el ARNr sea estable. La sonda específica para enterococos trabaja bien con 10% de formamida porque esta concentración le permite desestabilizar estructuras secundarias así como exponer la secuencia blanco.

El sitio blanco de la sonda Escsta (para *Staphylococcus* spp.), corresponde a la clase III, que es una zona de mediana facilidad de acceso, lo que implica la necesidad de una mayor concentración de agente desnaturante que permita exponer la zona de hibridación. Esto acorde al hecho de que es también la que presenta la mayor cantidad de estructuras secundarias y las más estables.

Por último, la región de hibridación para la sonda Porwal (específica para *Bacillus* spp.) entra en la clase IV, es decir la de más difícil acceso, lo que justificaría la presencia de una gran cantidad de agente desnaturante que permita la apertura de la horquilla en el ARNr. Este oligo es también capaz de formar una de las estructuras secundarias más estables, y el que posee de los ΔG de hibridación más negativos después de Escsta. De acuerdo a esto se esperaría una mejor respuesta en concentraciones altas de formamida. Cabe mencionar en este punto que esta sonda fue siempre la que presentó la señal más baja y la más problemática durante la visualización de cepas puras. Lo anterior puede asociarse a la posibilidad de que la formamida resultara contraproducente al desestabilizar el híbrido si la correspondencia con la secuencia blanco no fuera totalmente homóloga. Esto podría ocurrir si las secuencias del ARNr 16S de las bacterias del género *Bacillus* presentes en el queso fueran distintas en algún número pequeño de bases, lo cual permitiría un apareamiento laxo e inestable. Lo anterior implica que el ΔG de hibridación de esta sonda sea más positivo del que se obtuvo teóricamente. Posiblemente sea necesario optimizar el diseño de este oligo con base en las secuencias de especies de *Bacillus* aisladas de queso Cotija con el fin de afinar el análisis.

En la Figura 9.2.9. se muestran las imágenes en campo claro y oscuro correspondientes a las hibridaciones de cada cepa pura con su sonda específica a las condiciones óptimas.



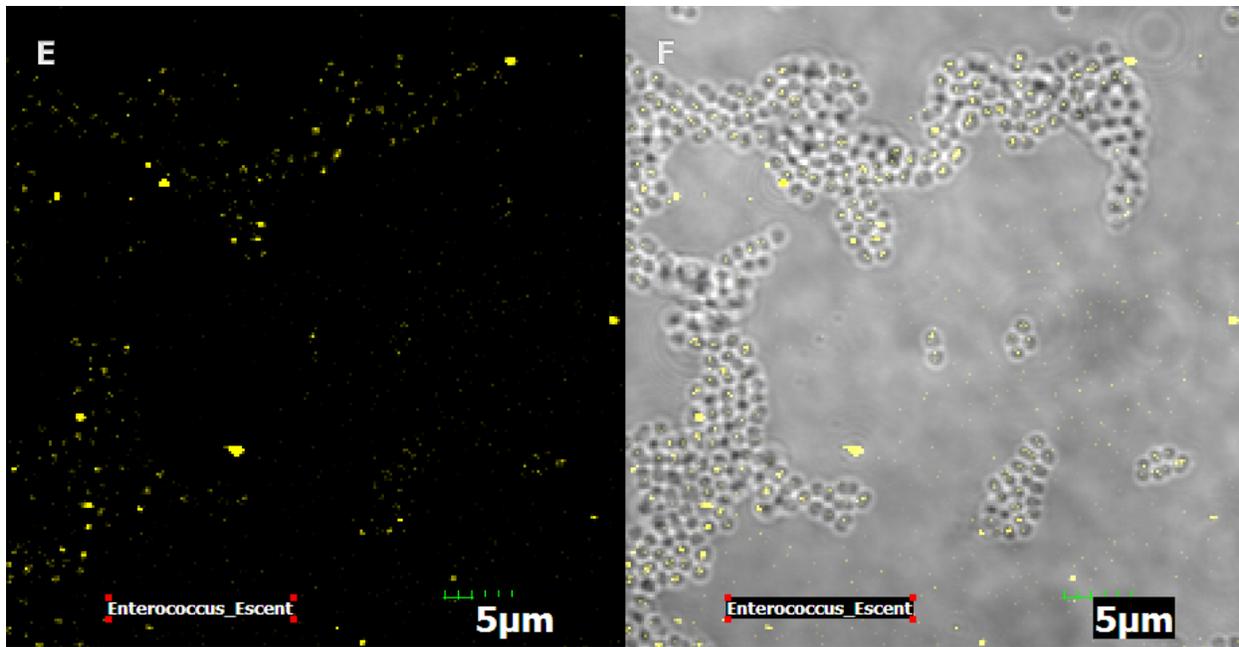


Fig. 9.2.9. Hibridación positiva de cepas puras contra su respectiva sonda específica. Paneles A y B, *Bacillus pumilus* contra Porwal en campo oscuro y claro respectivamente. Paneles C y D, *Staphylococcus psifermentans* contra Escsta en campo oscuro y claro respectivamente. Paneles E y F, *Enterococcus faecalis* contra Escent en campo oscuro y claro respectivamente.

En las imágenes anteriores se observan marcas de señal inespecífica, y que se refiere a la presencia de señal que no corresponde a la morfología de célula alguna y que puede deberse a la presencia de partículas extrañas que autofluorescen y que no deben confundirse como falsos positivos. De aquí se derivaron los criterios que permitieron identificar lo que se consideró una célula con señal positiva en las muestras provenientes de queso:

- 1.- La señal debía encontrarse dentro del límite de la morfología de la célula.
- 2.- El tamaño de la célula tendría que ser proporcional, es decir, si se observaba un contorno con señal que fuera demasiado grande o demasiado pequeño (mucho menor a 1 μm) como para considerarse una bacteria, no se tomó en cuenta.

Es posible en la obtención de imágenes que no todas las células que se observan en campo claro tengan señal fluorescente al sobreponer la misma imagen en campo oscuro. Esto puede deberse principalmente a factores asociados al enfoque cuando las células no se encuentran formando una monocapa homogénea o a la posibilidad de que algunas bacterias emitan señal demasiado débil por causas como por ejemplo baja concentración de ARNr.

De cualquier forma, es difícil que la hibridación aún en cepas puras ocurra en todas las células presentes en la muestra posiblemente debido a diferencias en la difusión de la sonda en la preparación. Para puntualizar la eficiencia de la hibridación, se realizaron cálculos determinando el porcentaje de células que no emitieron señal (Tabla 9.2.10).

Tabla 9.2.10. Eficiencia de la hibridación

	Cuenta total *	Con señal	% sin señal	Prom	SD
<i>Bacillus</i> vs EUB338	490	409	17	8.6	7.1
	821	766	7		
	75	73	3		
<i>Staphylococcus</i> vs EUB338	1490	1304	12	12.9	1.2
	980	840	14		
	1817	1601	12		
<i>Enterococcus</i> vs EUB338	1021	841	18	14.5	3.6
	1036	879	15		
	719	643	11		
<i>Bacillus</i> vs Porwal	76	64	16	17.5	2.9
	151	127	16		
	149	118	21		
<i>Staphylococcus</i> vs Escsta	1078	862	20	14.7	4.9
	675	604	11		
	1042	901	14		
<i>Enterococcus</i> vs Escent	662	565	15	16.0	1.2
	464	386	17		
	560	468	16		

* Cada cuenta total corresponde a la suma de células con y sin señal en tres campos independientes.

En todos los casos, el porcentaje de células sin señal es muy parecido (ver desviación estándar) y oscila entre 8.6 y 17.5%. Estos porcentajes representan la tasa de señales subestimadas al

hacer las hibridaciones. Como todos los valores son muy parecidos entre ellos, podemos inferir que la subestimación no ocurre de manera preferencial para ninguna de las sondas específicas.

Este cálculo será de utilidad para corregir el conteo en los paquetes celulares provenientes de muestras de queso Cotija.

Resultados de FISH en queso

Para que fuera posible la visualización de células bacterianas extraídas de queso, fue necesario hacer un tratamiento al paquete celular fijo, previo a la visualización, (Figura 9.2.10.), hasta que se logró eliminar las señales autofluorescentes provenientes del alimento.

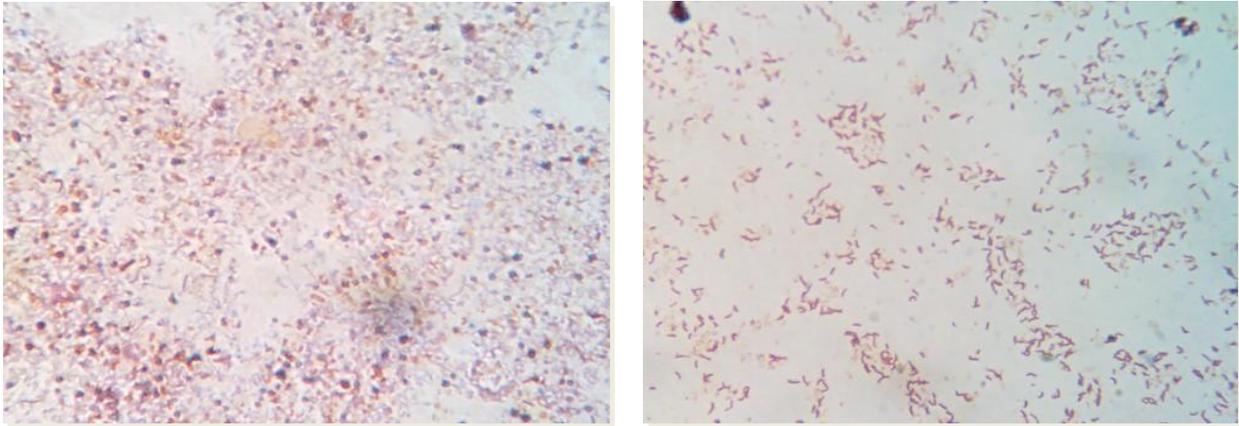


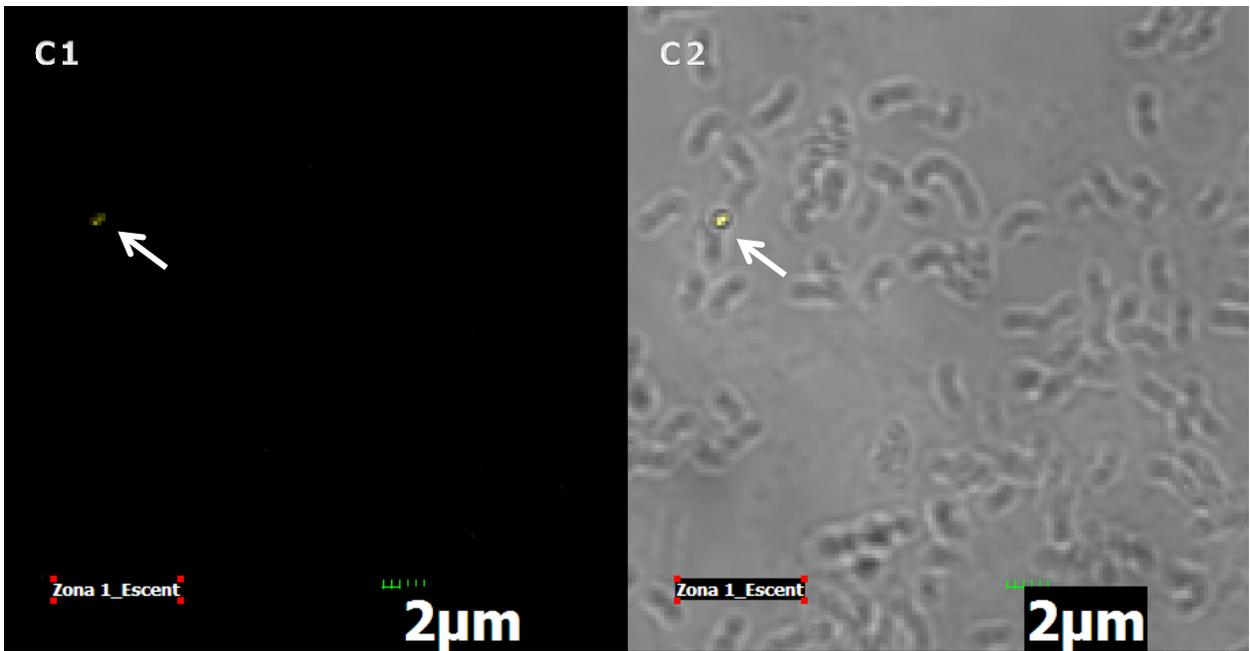
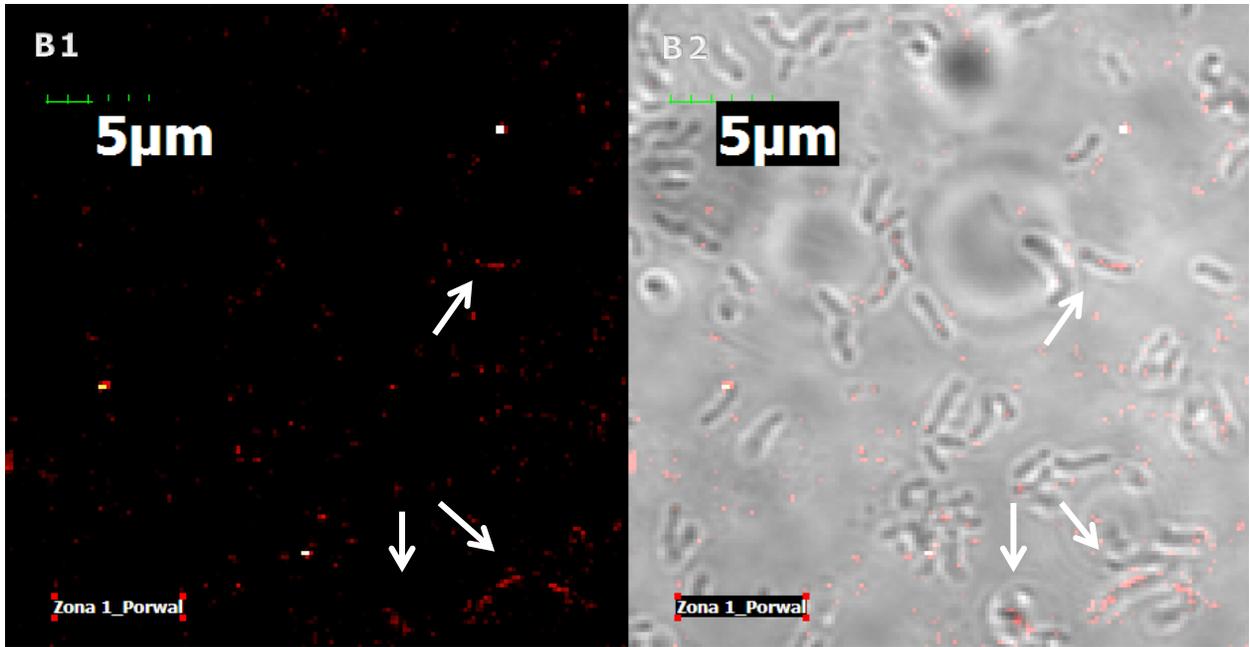
Fig. 9.2.10. Izq. Paquete celular sin tratamiento de lavado antes de la observación. Der. Paquete celular con tratamiento de lavado antes de la observación (ver punto 7.13 de Metodologías). Tinción con safranina.

Cuando se tuvieron los paquetes celulares limpios y fijos, se procedió a montar en portaobjetos cubiertos de poli-L-lisina y a hibridar en las condiciones establecidas para cada microorganismo.

Se analizaron alrededor de 30 campos por cada hibridación con el objetivo 100X del microscopio confocal y se realizaron 3 hibridaciones independientes, de las cuales se contaron las células que presentaron señal positiva (ver Tabla 9.2.11.).

En la siguiente serie de imágenes (Figuras 9.2.11. a 9.2.15.), se muestran ejemplos en cada zona de lo que se consideró señal positiva indicada con flechas blancas.





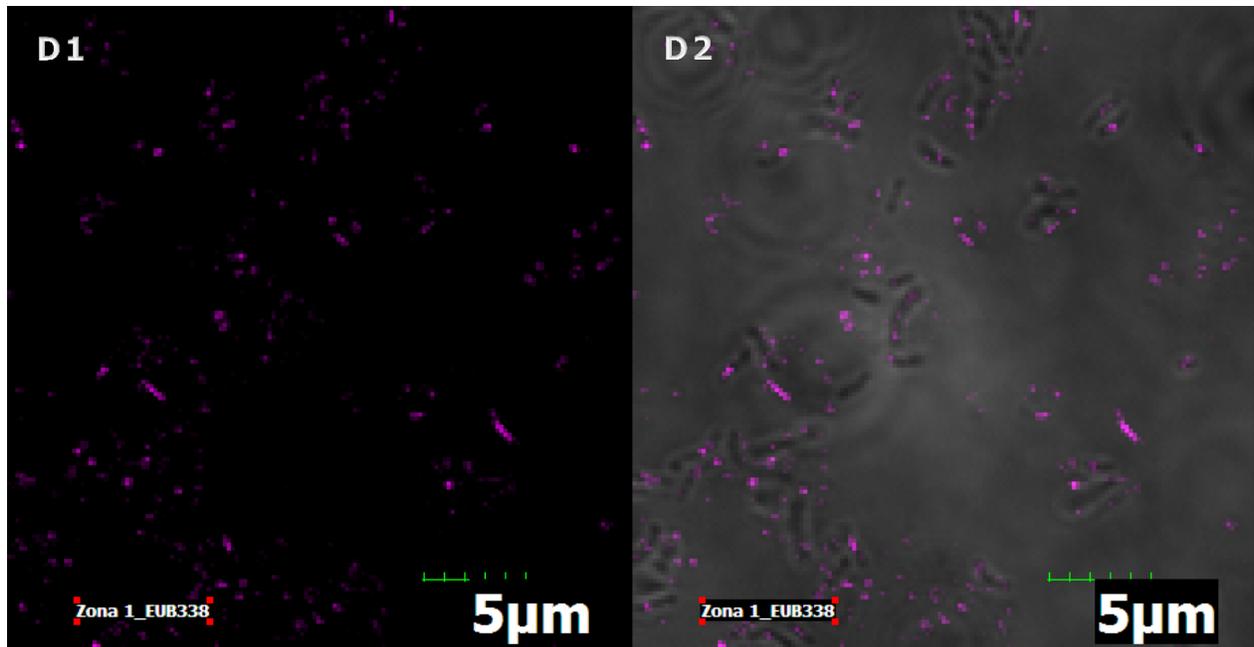
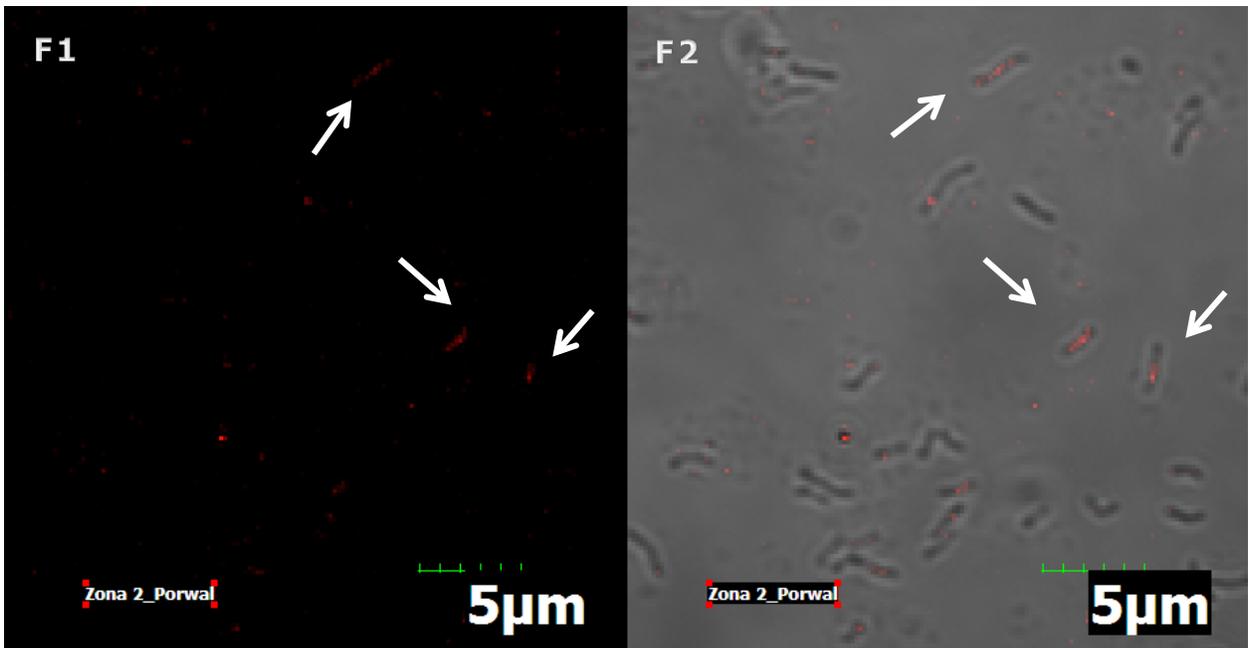
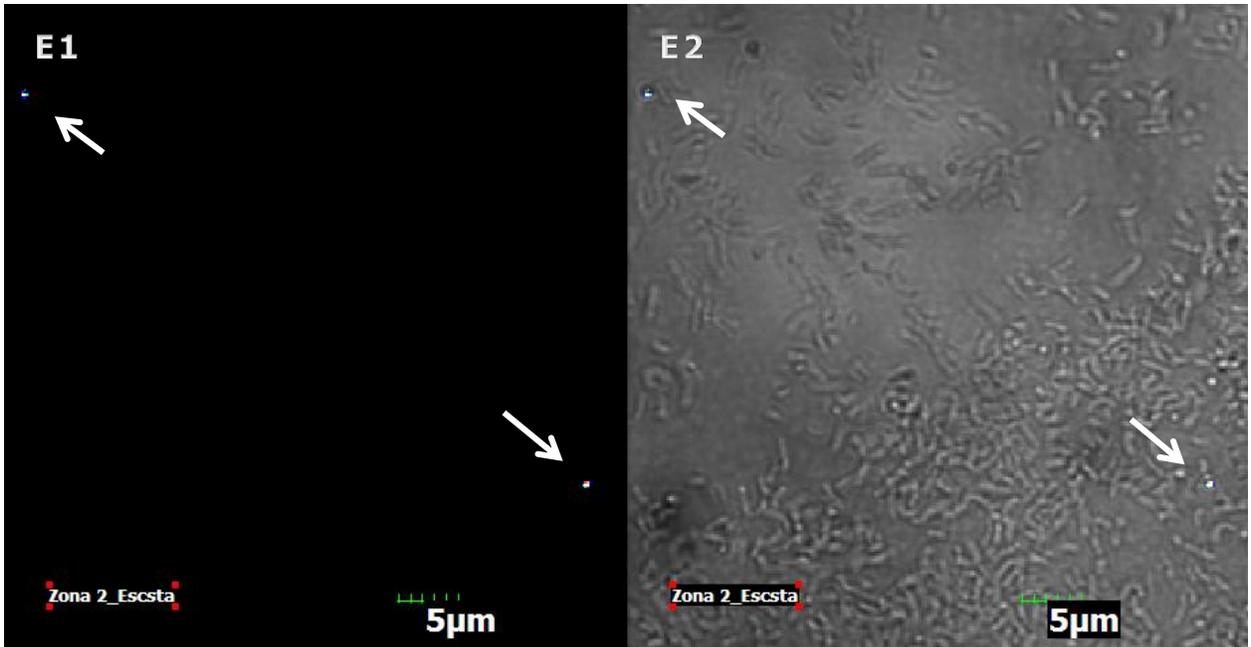


Fig. 9.2.11. Ejemplos de hibridaciones positivas en paquete celular extraído de Zona 1 contra sondas específicas y sonda universal. Paneles A1 y A2, hibridación con sonda Escsta (específica para *Staphylococcus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles B1 y B2, hibridación con sonda Porwal (específica para *Bacillus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles C1 y C2, hibridación con sonda Escent (específica para *Enterococcus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles D1 y D2, hibridación con sonda EUB338 (universal para bacterias) en campo oscuro y campo claro respectivamente.



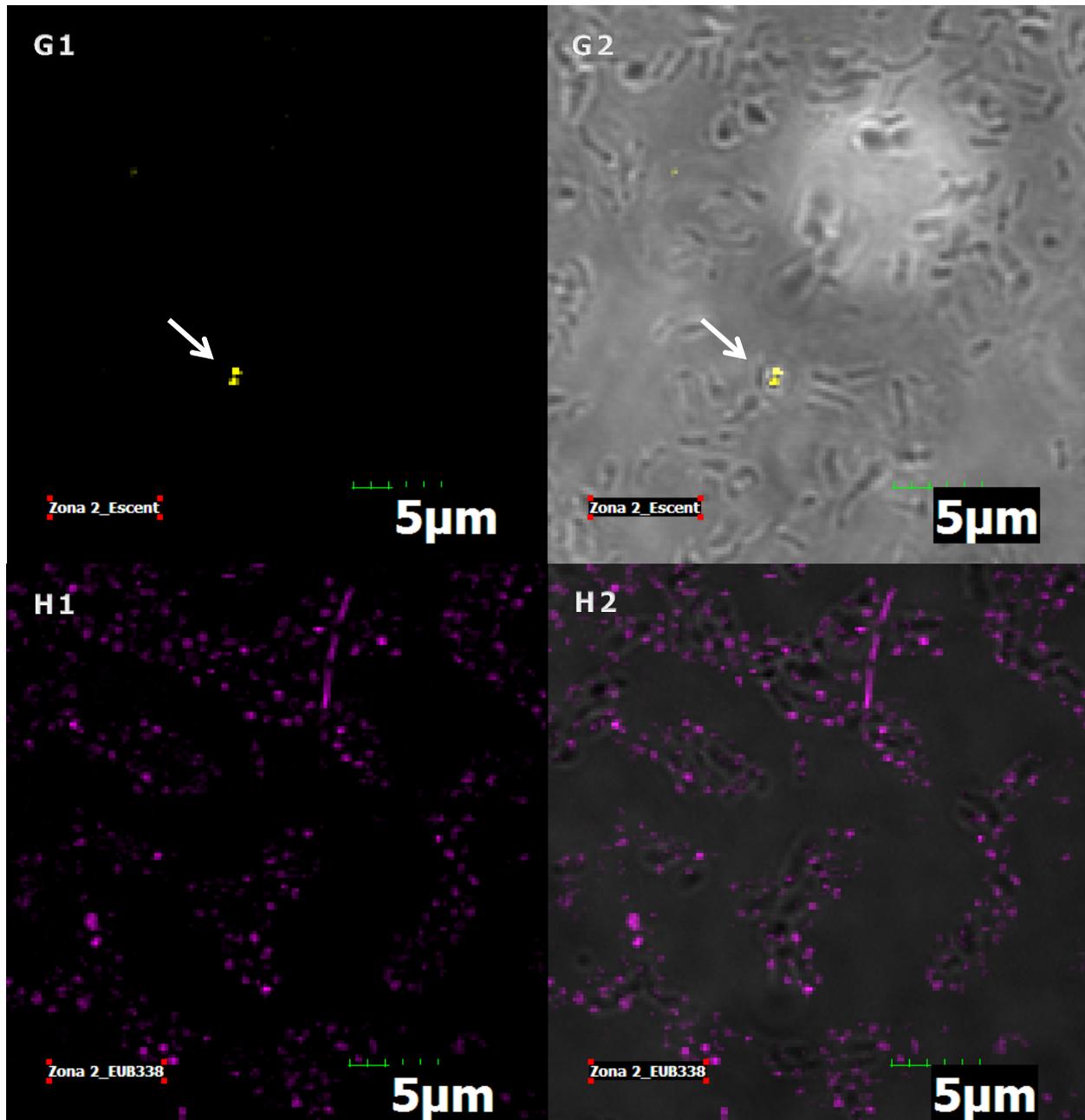
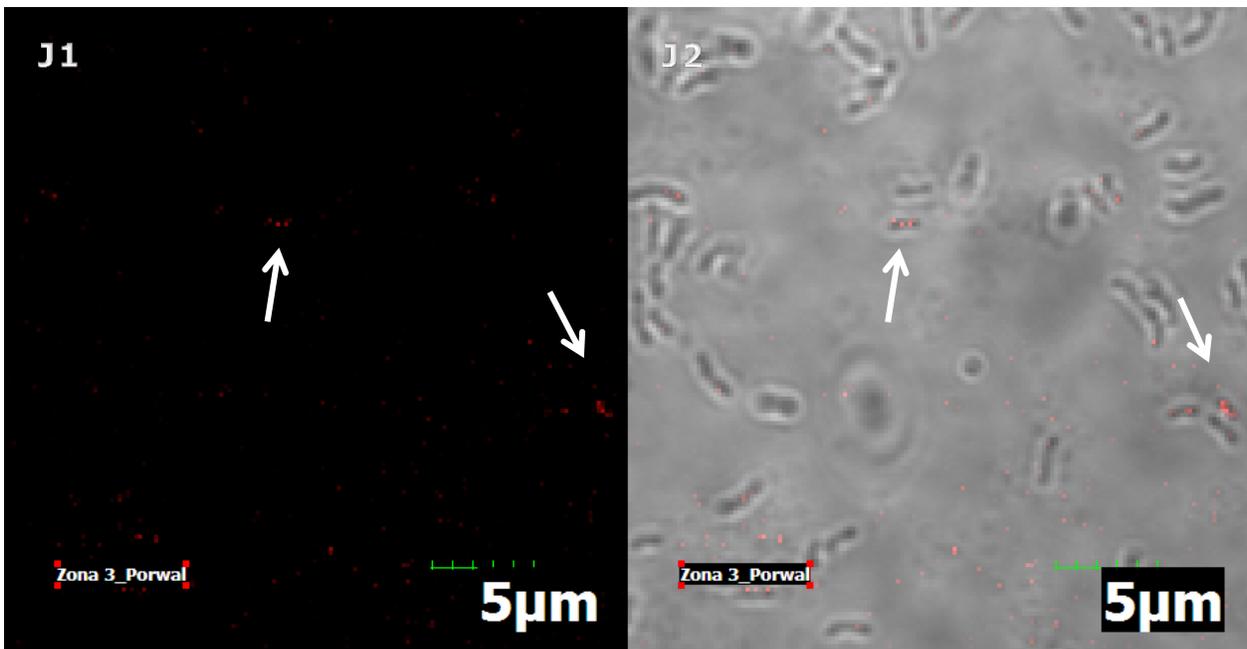
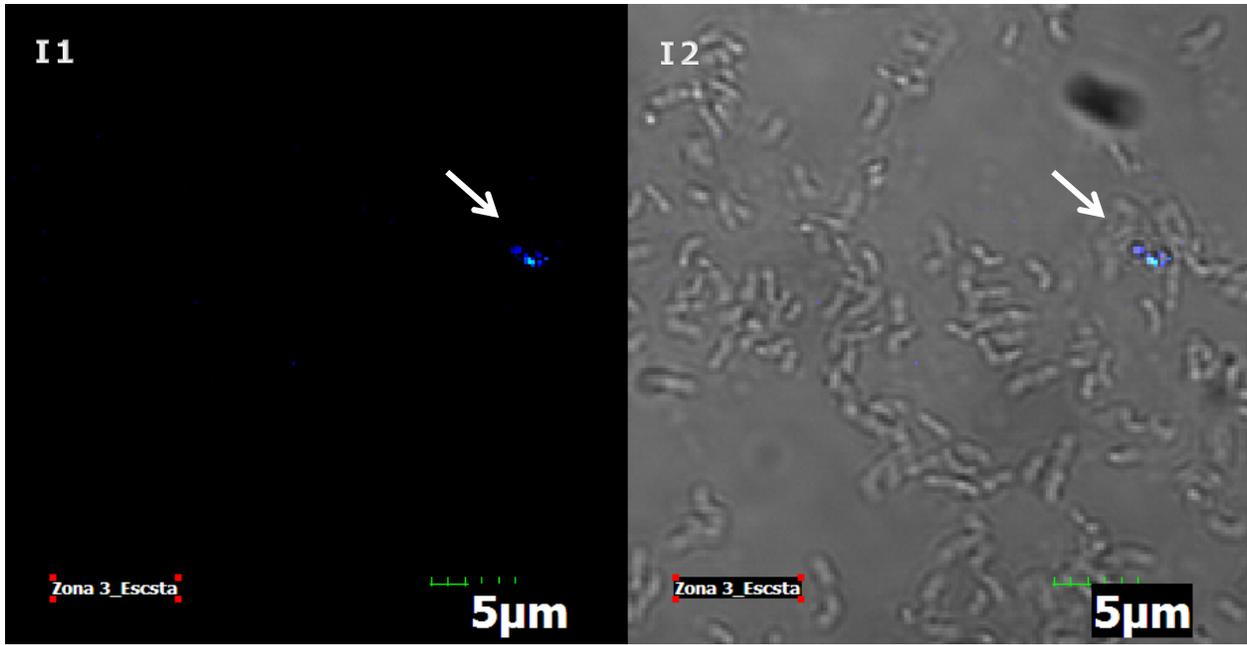


Fig. 9.2.12. Ejemplos de hibridaciones positivas en paquete celular extraído de Zona 2 contra sondas específicas y sonda universal. Paneles E1 y E2, hibridación con sonda Escsta (específica para *Staphylococcus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles F1 y F2, hibridación con sonda Porwal (específica para *Bacillus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles G1 y G2, hibridación con sonda Escent (específica para *Enterococcus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles H1 y H2, hibridación con sonda EUB338 (universal para bacterias) en campo oscuro y campo claro respectivamente.



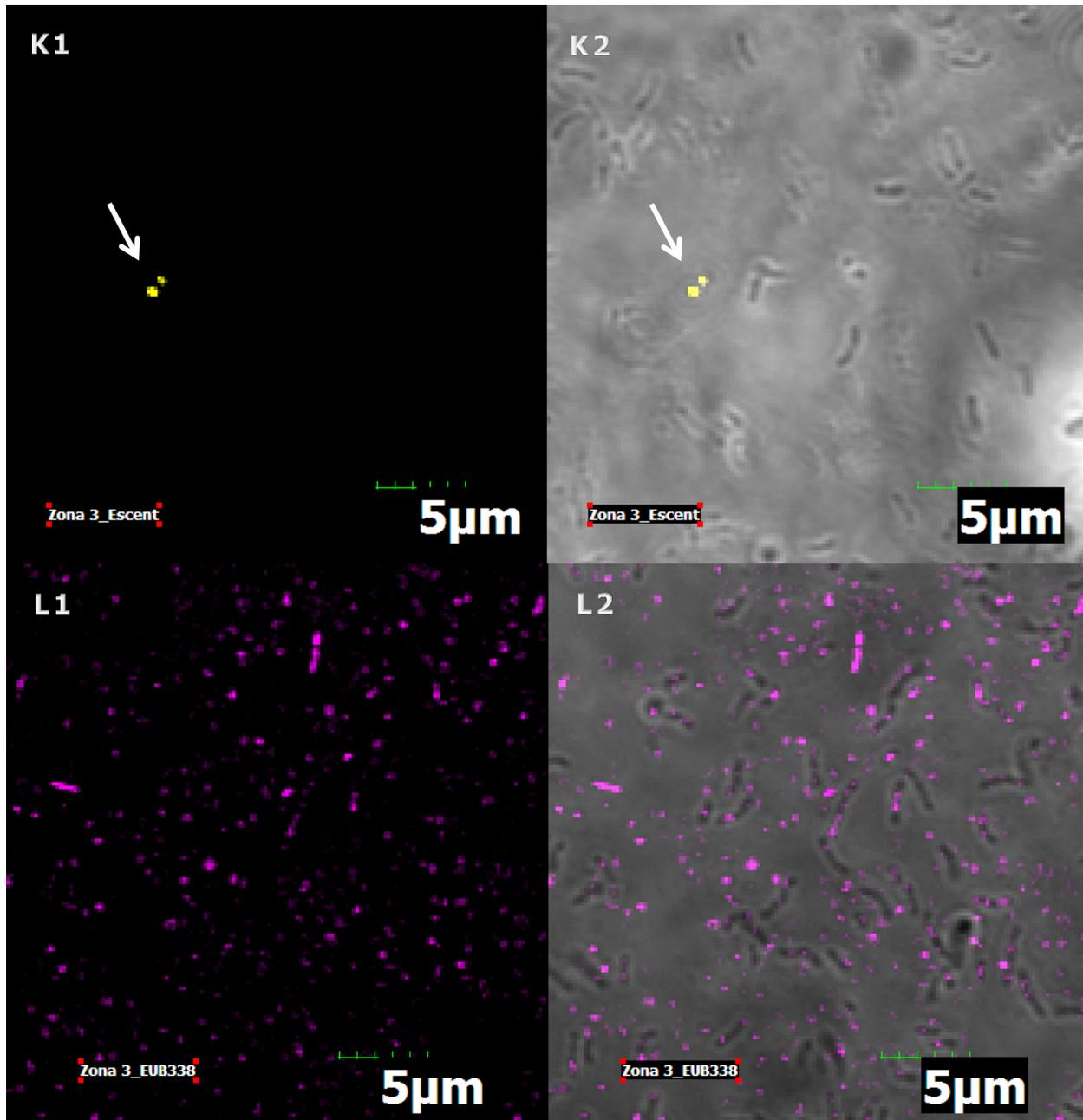
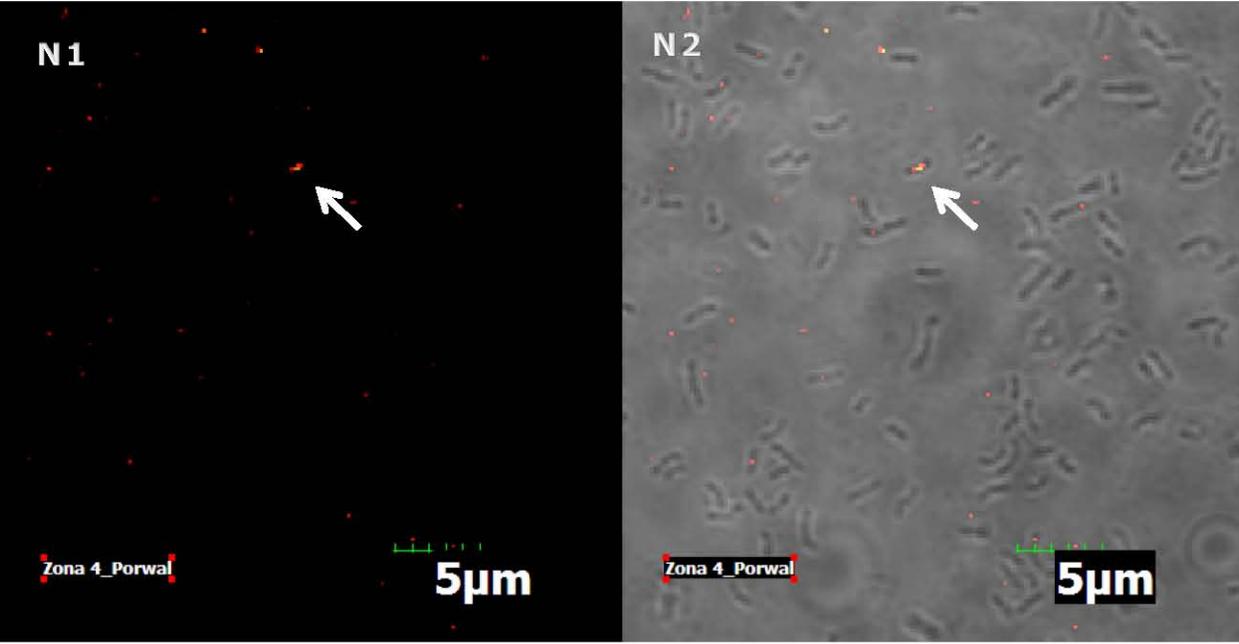
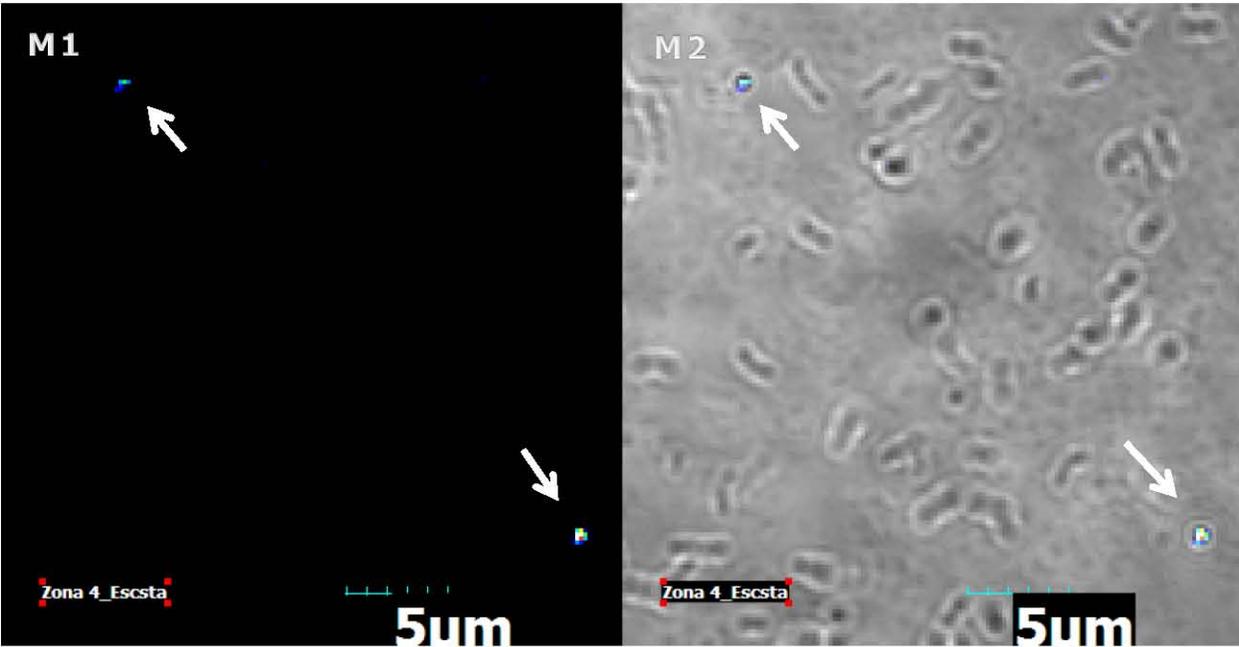


Fig. 9.2.13. Ejemplos de hibridaciones positivas en paquete celular extraído de Zona 3 contra sondas específicas y sonda universal. Paneles I1 e I2, hibridación con sonda Escsta (específica para *Staphylococcus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles J1 y J2, hibridación con sonda Porwal (específica para *Bacillus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles K1 y K2, hibridación con sonda Escent (específica para *Enterococcus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles L1 y L2, hibridación con sonda EUB338 (universal para bacterias) en campo oscuro y campo claro respectivamente.



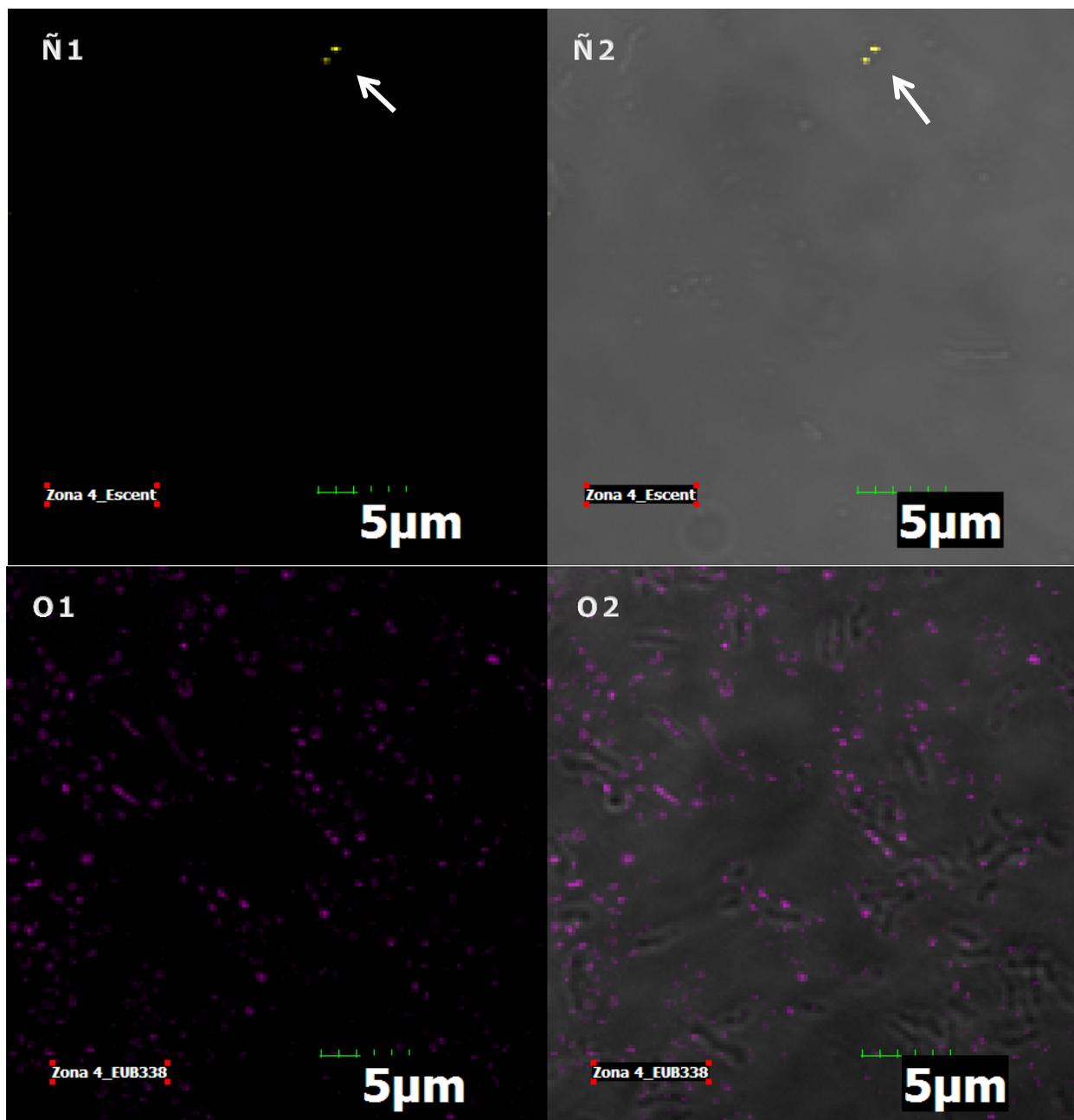
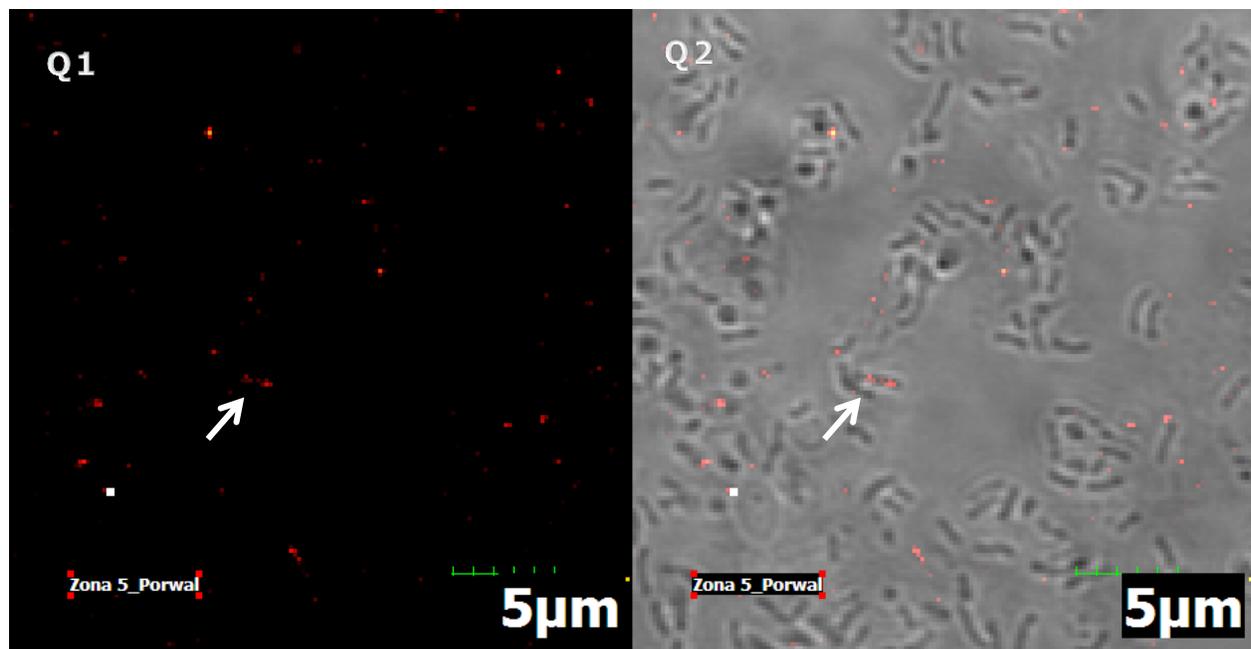
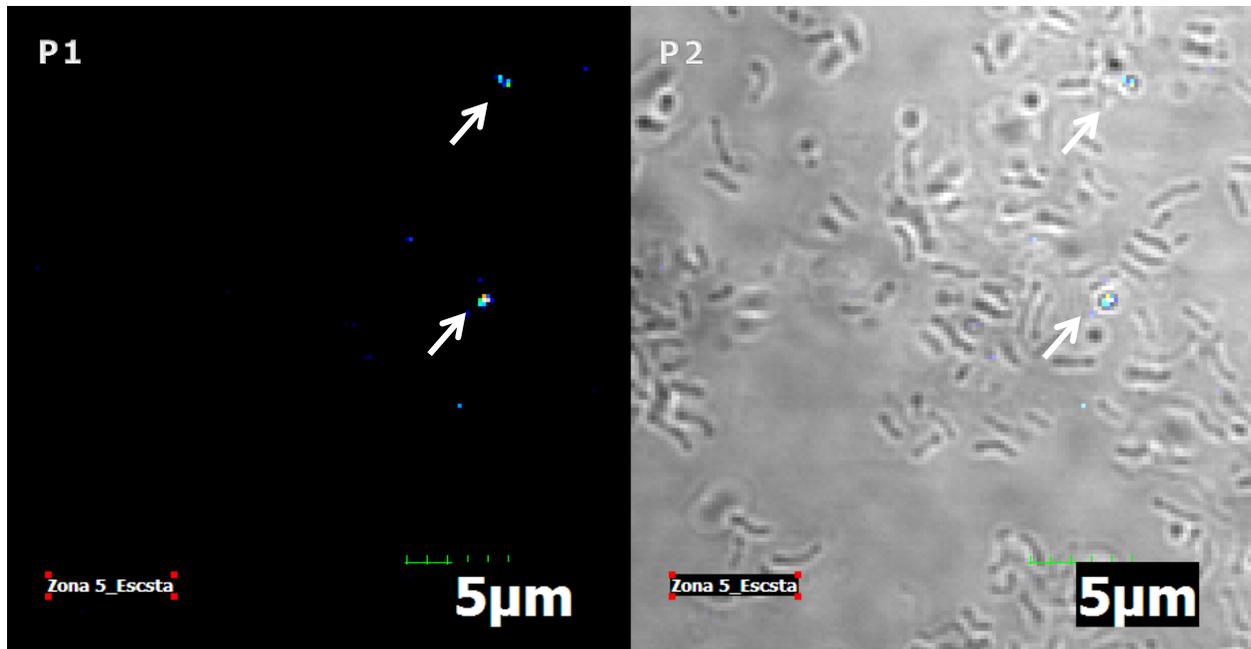


Fig. 9.2.14. Ejemplos de hibridaciones positivas en paquete celular extraído de Zona 4 contra sondas específicas y sonda universal. Paneles M1 y M2, hibridación con sonda Escsta (específica para *Staphylococcus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles N1 y N2, hibridación con sonda Porwal (específica para *Bacillus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles Ñ1 y Ñ2, hibridación con sonda Escent (específica para *Enterococcus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles O1 y O2, hibridación con sonda EUB338 (universal para bacterias) en campo oscuro y campo claro respectivamente.



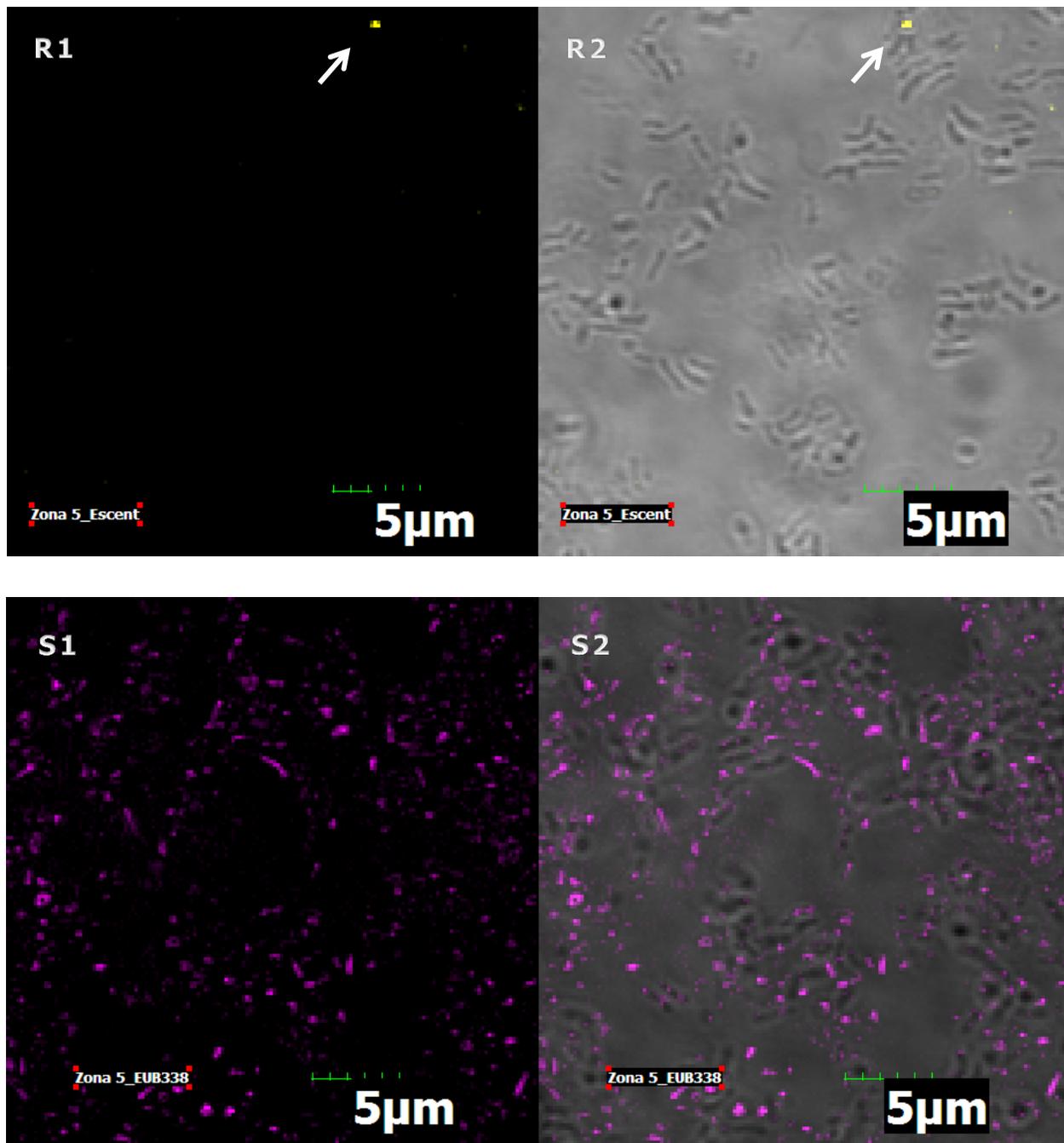


Fig. 9.2.15. Ejemplos de hibridaciones positivas en paquete celular extraído de Zona 5 contra sondas específicas y sonda universal. Paneles P1 y P2, hibridación con sonda Escsta (específica para *Staphylococcus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles Q1 y Q2, hibridación con sonda Porwal (específica para *Bacillus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles R1 y R2, hibridación con sonda Escsent (específica para *Enterococcus* spp.) en campo oscuro y campo claro respectivamente. Paneles S1 y S2, hibridación con sonda EUB338 (universal para bacterias) en campo oscuro y campo claro respectivamente.

La identificación *in situ* de las células individuales por la técnica de FISH puede verse obstaculizada por las diferencias en la accesibilidad de los sitios de destino de la sonda y la permeabilidad limitada de la pared celular (76), esto aunado a que el número de ribosomas por célula es muy variable tanto entre especies y dentro de las células de cualquier especie, dependiendo de la tasa de crecimiento (77).

En todos los experimentos realizados en cepas puras con el fin de optimizar las condiciones, se trabajó con cultivos que se encontraba a mitad de la fase logarítmica, situación que no necesariamente fue tal en la microbiota extraída de la muestra; donde las poblaciones bacterianas se encontraban en distintas fases de crecimiento, lo cual implicó diferencias en el estado de la pared celular así como en el la cantidad de ARNr que pudieran contener.

Hibridaciones en fase estacionaria tendrían como consecuencia que, debido a que en esta fase de crecimiento la pared celular es más gruesa gracias a la baja tasa de reproducción, la entrada de la sonda fuera menos eficiente. Además, a baja tasa de crecimiento, el número de copias de ARNr en la célula disminuye, afectando la cantidad de señal emitida.

Otro obstáculo en este caso en particular, fue la presencia de moléculas autofluorescentes que no pudieron ser totalmente eliminadas de la suspensión de células, lo que dificultó la visualización de señales positivas afectando la calidad de las imágenes.

Una vez que se llevó a cabo el conteo, se ajustó de acuerdo al cálculo de subestimación con los datos de la Tabla 9.2.10 y se realizó el análisis estadístico para discriminar diferencias comparando entre zonas (Tabla 9.2.11 y Figura 9.2.16.).

Tabla 9.2.11. Conteo de células con sondas específicas en 20 μ L de suspensión de células de paquete celular extraído de cada zona de queso Cotija.

Zona	Microorganismo	H1*	H2*	H3*	Prom†	SD	Eficiencia	Ajuste ^Δ
1	<i>Bacillus</i>	307	485	869	554 ^a	287	17.5%	651
1	<i>Staphylococcus</i>	938	450	678	689 ^a	244	14.7%	790
1	<i>Enterococcus</i>	561	531	521	538 ^a	21	16.0%	624
2	<i>Bacillus</i>	204	877	470	517 ^a	339	17.5%	607
2	<i>Staphylococcus</i>	991	912	129	677 ^a	477	14.7%	777
2	<i>Enterococcus</i>	100	323	673	365 ^a	289	16.0%	424
3	<i>Bacillus</i>	421	627	591	546 ^a	110	17.5%	642
3	<i>Staphylococcus</i>	508	572	491	524 ^a	43	14.7%	601
3	<i>Enterococcus</i>	172	474	358	335 ^a	152	16.0%	388
4	<i>Bacillus</i>	242	368	411	340 ^a	88	17.5%	400
4	<i>Staphylococcus</i>	298	294	71	221 ^a	130	14.7%	253
4	<i>Enterococcus</i>	131	421	692	415 ^a	281	16.0%	481
5	<i>Bacillus</i>	600	956	1015	857 ^a	225	17.5%	1007
5	<i>Staphylococcus</i>	865	1687	1569	1374 ^a	444	14.7%	1576
5	<i>Enterococcus</i>	904	840	1428	1057 ^a	323	16.0%	1227

* Hn=Evento independiente de hibridación. † Misma letra indica que no existe diferencia significativa con una $\alpha=0.05$. ^Δ Valores dados en células/20 μ L de suspensión celular.

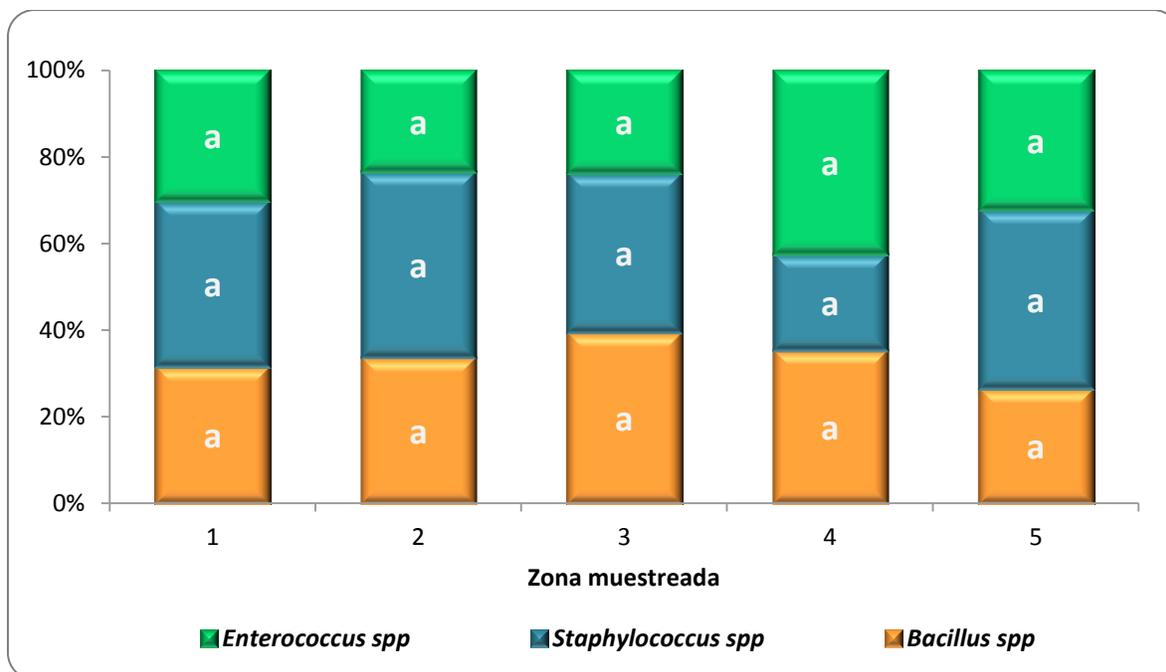


Fig. 9.2.16. Proporción de cada género en las diferentes zonas.
Misma letra indica que no existe diferencia significativa con una $\alpha=0.05$.

Se observó que tanto *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.* y *Bacillus spp.* se encuentran distribuidos de forma homogénea en toda la matriz del queso sin preferencia por ninguno de los géneros en una u otra zona. Posiblemente las necesidades nutricionales y de presencia de oxígeno de los géneros estudiados son muy parecidas entre sí y entran en los intervalos de gradientes observados en el análisis fisicoquímico, lo que se vio reflejado en que las actividades enzimáticas de proteólisis y lipólisis son semejantes en todas las zonas del queso.

Cuando se analizó la presencia de cada género por zona, no se encontró una superioridad numérica clara de ninguno de ellos, es decir que ninguno resultó ser dominante. Esto es acorde con el trabajo de la tesis de maestría de Zúñiga-Bustos (2009) (28), que por métodos moleculares concluye que *Enterococcus* no es un género dominante en queso Cotija pero que se mantiene presente durante todo el proceso de maduración y hasta el final del mismo (3 meses).

Por otro lado, la diferencia en el perfil electroforético de las proteínas de la corteza, donde las condiciones cambian drásticamente (sobre todo en cuanto a la disponibilidad de oxígeno), seguramente está asociado al aumento en la cuenta bacteriana y su diversidad en esa zona y no a la predominancia de alguno de los grupos estudiados.

Los gradientes fisicoquímicos observados se deben principalmente a la pérdida de humedad gradual que ocurre a partir de la exposición de la superficie de la pieza a la atmósfera, pues en el queso Cotija, a pesar de ser de gran formato, los gradientes no tienen intervalos tan grandes como para hacer una selección de la microbiota dentro del producto, al menos de los tres géneros estudiados.

El conteo con la sonda universal (Tabla 9.2.12.), permitió estimar la carga microbiana en el queso (Figuras 9.2.11 a 9.2.15, paneles D, H, L, O y S) en unidades de células por gramo a

partir del promedio del valor ajustado del número total de células con señal positiva en los paquetes celulares extraídos de queso, hibridados con la sonda universal. El cálculo se realizó a sabiendas de que el número de células correspondía al contenido en una alícuota de 20 μL tomada de un volumen total de 600 μL de suspensión de células que a su vez contenía el paquete celular extraído a partir de 15 g de queso.

Tabla 9.2.12. Conteo de células con sonda universal en 20 μL de suspensión de células de paquete celular extraído de cada zona de queso Cotija.

Zona	H1*	H2*	H3*	Prom	SD	Eficiencia [∞]	Ajuste
1	1.6	1.1	1.6	1.4X10 ⁴	0.3X10 ⁴	12%	1.6X10 ⁴
2	2.7	1.6	1.2	1.8X10 ⁴	0.8X10 ⁴	12%	2.1X10 ⁴
3	1.7	1.4	1.6	1.6X10 ⁴	0.2X10 ⁴	12%	1.8X10 ⁴
4	1.3	1.0	1.2	1.2X10 ⁴	0.2X10 ⁴	12%	1.3X10 ⁴
5	3.3	2.0	1.9	2.4X10 ⁴	0.8X10 ⁴	12%	2.7X10 ⁴

* H=Evento independiente de hibridación.

∞ Calculada del promedio de eficiencia de hibridación de la sonda universal contra los tres géneros analizados.

Al final se obtuvo el número de 3.8X10⁴ células/g de queso Cotija. Este valor es menor en un orden de magnitud al obtenido en la misma pieza por método tradicional, (7.1X10⁵ UFC/g), al sembrar diluciones decimales de suspensión de queso en solución salina al 0.85% p/v pH 7 estéril en agar cuenta en placa. Esta pérdida se puede explicar en los pasos de lavado previo a la observación. Con este tratamiento se garantizó la disminución de partículas autofluorescentes que, de haberse omitido, hubieran imposibilitado la obtención de imágenes confiables para el análisis; aunque la manipulación produjo una pérdida considerable de paquete celular.

Por otro lado, el cálculo de la carga bacteriana en el queso permitió examinar qué porcentaje de la cuenta total representan los géneros analizados en la población bacteriana total del queso. Los siguientes cálculos se realizaron a partir de los valores de la Tabla 9.2.11. Por ejemplo, del promedio de la cuenta en las cinco zonas, se obtienen 661 células/20 μL de células de *Bacillus*, que corresponde a 1,322 células/g de queso, es decir, el 3.5% del total. En cuanto al género *Staphylococcus*, el promedio de la cuenta es de 799 células/20 μL , lo que equivale a 1,598 células/g de queso, aportando 4.2%. Y por último, el promedio de enterococos es de 629 células/20 μL , ó 1,258 células/g de queso, es decir el 3.3% de la cuenta total calculada con la sonda universal.

En resumen, el aporte numérico de los tres géneros estudiados corresponde únicamente al 11% de la microbiota total de acuerdo a la suma de la cuenta de microorganismos en las cinco zonas (*Bacillus* más *Staphylococcus* más *Enterococcus*). Esto equivale a decir que desconocemos el comportamiento del 89% de la comunidad bacteriana en esta pieza de queso Cotija. El resto de los microorganismos podrían pertenecer a los géneros identificados con anterioridad por el grupo de trabajo tales como *Lactobacillus* spp, *Lactococcus* sp, *Vagococcus* spp y *Marinilactibacillus* spp o a una mezcla de géneros que no han sido todavía detectados por los métodos empleados.

El porcentaje tan alto de microbiota bacteriana inexplorada podría relacionarse con el hecho de que la mayoría de los trabajos anteriores donde se utilizan técnicas moleculares, se basan en la extracción del material genético total y la subsecuente amplificación de genes específicos. En estas metodologías el protocolo utilizado para lisar las células y extraer su ADN puede introducir muchos sesgos, por ejemplo, procedimientos demasiado drásticos fracturan el ADN y alteran los genes de interés, mientras que métodos más suaves pueden ser insuficientes para romper las células más resistentes dentro de la comunidad, por lo que el ADN utilizado para amplificación o clonación termina por representar sólo una parte de la población bacteriana.

Los protocolos basados en la PCR tienen sus propias desventajas no sólo debido a la posibilidad de formación de moléculas quiméricas, sino también a causa de cebado selectivo que conduce a la amplificación diferencial y la posible presencia de sustancias inhibitoras que afectan la reacción de PCR (46).

Entre los métodos moleculares más utilizados en el análisis de poblaciones dentro del grupo de trabajo, destaca la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) con la amplificación de regiones variables del gen ribosomal 16S. Cabe mencionar que no todas las bandas obtenidas han sido secuenciadas.

En cuanto a los trabajos basados en métodos tradicionales de cultivo, el sesgo se debe principalmente al desconocimiento de las condiciones de cultivo de las bacterias denominadas "no cultivables" (44).

Los problemas antes mencionados son un obstáculo real en los trabajos de diversidad microbiana. El número de especies de procariontes válidamente nombrados es actualmente un poco más de 6200. Sin embargo, sobre la base de caracterización de la subunidad pequeña del ADN_r de comunidades completas y otros enfoques, el número más exacto de especies presentes se puede deducir que es por lo menos dos órdenes de magnitud mayor.

Lo anterior explica por qué las secuencias de ADN_r 16S obtenidas directamente del ambiente casi siempre difieren de aquellas presentes en las bases de datos de secuencias de especies procariontes nombradas; sólo muy raramente ocurre que una secuencia recuperada del entorno coincida completamente con el de una especie conocida (77).

El gran número de secuencias nuevas obtenidas por secuenciación llevaron a la conclusión de que el número de especies procariontes descritos sea a lo sumo de 1-2% del número real de especies bacterianas existentes. Algunas estimaciones son aún más bajas y sugieren que la cantidad de especies de bacterias cultivables a partir de un entorno determinado es de menos de 0,1% (78, 79, 80, 81).

De acuerdo a Amann (1995) (46), el porcentaje de procariontes cultivables en diferentes hábitats es el siguiente: en agua de mar 0.001-0.1%; en agua dulce 0.25%; en lagos mesotróficos 0.1-1%; en aguas de estuarios no contaminadas 0.1-3%; en lodos activados 1-15% y en suelo alrededor del 0.3%.

Un ejemplo claro de esta falta de conocimiento en ecología bacteriana es el de un alfa-proteobacteria cuyo filotipo fue designado como SAR11, identificado por primera vez en el mar

oligotrófico de los Sargazos (82). Este organismo representa un tercio o más de las células presentes en las aguas superficiales del mar y cerca de una quinta parte de las células presentes en la zona del océano mesopelágico. Los miembros del grupo SAR11 pueden representar hasta un 50% de la comunidad microbiana total en algunas regiones. El papel biogeoquímico del grupo SAR11 sigue siendo incierto, pero este grupo microbiano obviamente se encuentra entre los organismos más exitosos de la Tierra. Recientemente SAR11 ha podido cultivarse utilizando un enfoque novedoso, pero la densidad de células obtenidas es extremadamente baja (83).

Como en el caso anterior, muchos de los procariontes más abundantes en la naturaleza todavía no se han podido cultivar, lo que entorpece el reconocimiento de nuevos géneros y la descripción de poblaciones microbianas en su totalidad.

El análisis de poblaciones microbianas presentes en un alimento fermentado será más completo al integrar la información que aporta la utilización de métodos dependientes e independientes de cultivo contrastando aquella con la que contribuyen las técnicas que implican una PCR inicial con las que no. Toda la información obtenida es valiosa, lo importante es integrarla.

9. Conclusiones

Existen gradientes en la composición del queso Cotija que indican una mayor concentración de sal y calcio y mayor pH en las zonas cercanas a la corteza y que disminuyen en el centro. Contrario al a_w y la acidez, que incrementan en el centro de la pieza y que se ven disminuidas hacia la corteza.

El potencial redox es negativo en toda la matriz del queso, lo que indica una atmósfera deficiente de oxígeno el cual aumenta a mayor cercanía con la corteza.

Los perfiles electroforéticos obtenidos de cada zona sugieren que ocurre proteólisis de forma homogénea dentro de la matriz del queso. Únicamente en la corteza se observa un cambio en el perfil de hidrólisis de las caseínas.

Se observó liberación ácidos grasos cualitativa y cuantitativamente equivalente en todas las zonas, donde hay predilección por C13:0 y C18:2 pero no por butírico.

Fue posible establecer por el método molecular de FISH que la carga bacteriana en esta pieza de queso Cotija es de 3.8×10^4 UFC/g.

Los tres géneros estudiados en este trabajo representan únicamente el 11% de la población bacteriana total.

Los gradientes fisicoquímicos observados se deben principalmente a la pérdida de humedad gradual que ocurre a partir de la exposición de la superficie de la pieza a la atmósfera. Éstos no tienen intervalos tan grandes como para hacer una selección de la microbiota dentro del producto, al menos de los tres géneros estudiados.

Se encontró una distribución uniforme de *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., y *Enterococcus* spp. sin dominancia de ninguno de ellos en cada zona, lo que concuerda con los resultados del análisis de los perfiles de proteínas y lípidos.

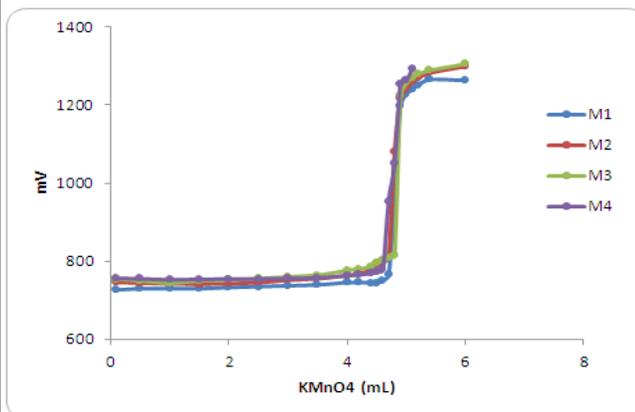
La alta variabilidad en los conteos indica que la técnica no está totalmente optimizada para este sistema.

Anexo 1. Pruebas de reproducibilidad del sistema de microelectrodos

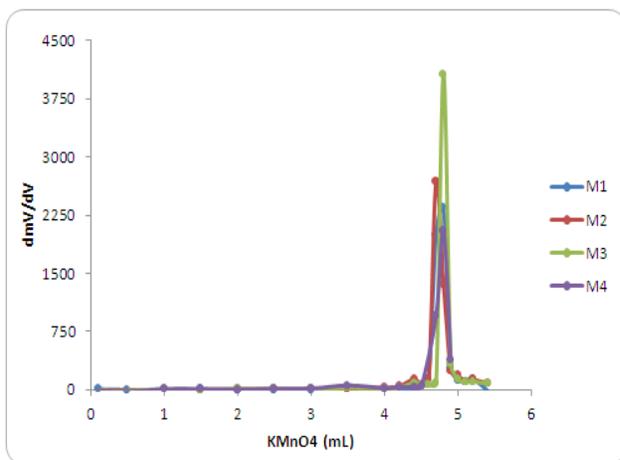
Se pesaron aproximadamente 0.0335 g de oxalato, se disolvieron en matraz Erlenmeyer con 25 mL de agua destilada y se adicionaron 5 mL de H₂SO₄ 9N. Se adicionaron volúmenes de permanganato de potasio y se tomó la lectura en cuanto ésta se estabilizó. La mezcla se mantuvo a 80°C durante toda la titulación.

A continuación se presentan los datos de las titulaciones efectuadas por cuadruplicado así como la gráfica de los mismos.

mL	M1	M2	M3	M4
0.1	726.8	745.5	754.1	756.3
0.5	729.8	744.5	750.2	755.2
1.0	730.2	742.3	744.5	752.7
1.5	729.8	741.4	749.9	753.8
2.0	733.1	742.4	751.7	754.5
2.5	735	745.4	755.7	754.7
3.0	737.4	751.7	760.2	755.8
3.5	739.5	755.4	764.5	757.5
4.0	745.7	763.5	776.7	763.2
4.2	745.3	768.7	780.6	765.5
4.4	745	777.7	785.7	768.9
4.5	744.3	791.4	795.1	772.7
4.6	750.8	797.2	801.2	777.8
4.7	765.1	810.8	807.9	954.3
4.8	965.4	1080.1	815.7	1050.3
4.9	1199.7	1216.5	1222.7	1255.3
5.0	1227.5	1241.1	1255.6	1263.1
5.1	1240.2	1259.5	1269	1293.5
5.2	1251.1	1269.7	1278.6	
5.3				
5.4	1265.6	1282.7	1289.2	
5.6				
5.8				
6.0	1263.4	1299.3	1305.1	



Para observar de forma clara el punto de inflexión de las curvas, se obtuvo la primera derivada y el cálculo de la normalidad del permanganato así como su desviación estándar, lo que nos asegura que los datos fueron reproducibles.



	M1	M2	M3	M4
Ptos eq (mL KMnO4)	4.8000	4.7000	4.8000	4.8000
Oxalato (g)	0.0337	0.0337	0.0337	0.0337
N KMnO4	0.1047	0.1069	0.1047	0.1047
Prom	0.1052			
SD	0.0011			

$$N = \frac{\text{g oxalato}}{(0.06701)(\text{mL KMnO4})}$$

Anexo 2. Método de Lowry para medir proteína

Reactivo A: 2% de Na_2CO_3 en NaOH 0.1 N

Reactivo B: 0.5% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en tartrato doble de sodio y potasio al 1%

Reactivo C: Mezclar 50 mL de reactivo A con 1 mL de reactivo B

Reactivo D: Reactivo de Folin diluido 1:5

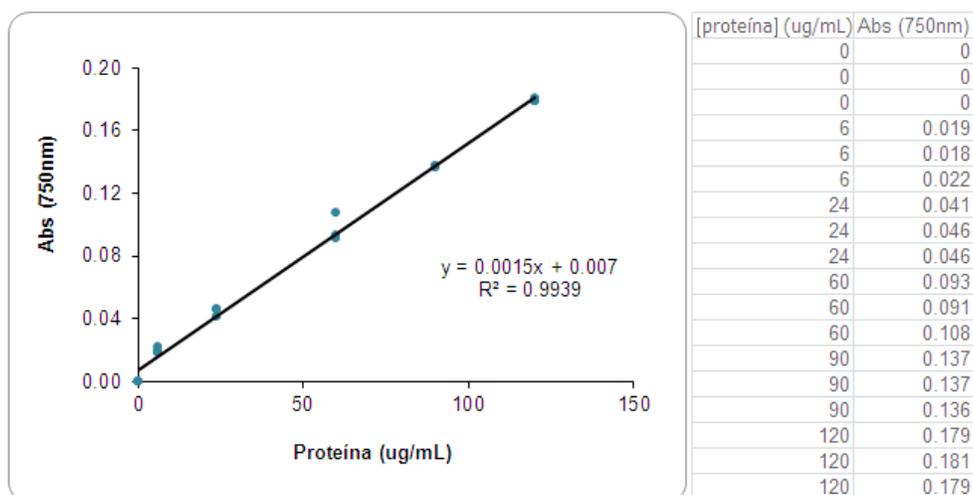
Se mezcló 1 mL de muestra con 1 mL de reactivo C y se dejó reposar durante 10 min. Se adicionó 0.5 mL de reactivo D y se dejó reposar en oscuridad al menos 30 min. Se leyó la muestra frente a blanco de reactivos a 750 nm.

La curva patrón se preparó de albúmina bovina con 5 puntos que incluyeron concentraciones de 5-100 $\mu\text{g/mL}$.

Para la curva patrón se preparó la solución stock de 100 $\mu\text{g/mL}$ pesando 1 mg de albúmina bovina y aforando en matraz de 10 mL.

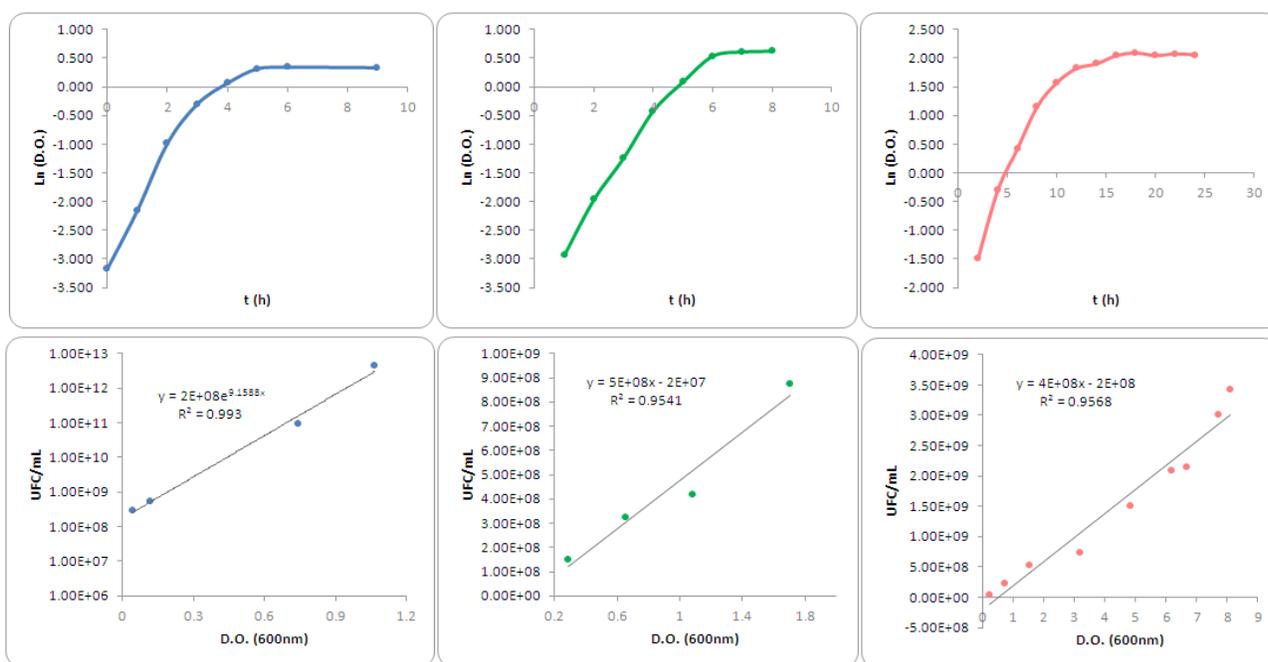
Tubo	[Albúmina] ($\mu\text{g/mL}$)*	Volumen de stock (μL)	Volumen H_2O dest (μL)	Volumen final (mL)
Blco	0	0	1,000	1
1	6	50	950	1
2	24	200	800	1
3	60	500	500	1
4	90	750	250	1
5	120	1,000	0	1

*El peso real de albúmina fue de 1.2 mg.



Anexo 3. Cinéticas de crecimiento y relación UFC/mL para cepas puras

t (horas)	<i>Bacillus pumilus</i>						Datos de Sergio Matamoros Ortega								
	D.O.	F.D.	D.O. corregid	Ln(D.O.)	UFC/mL		<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>					
						D.O.	F.D.	D.O. corregida	Ln(D.O.)	UFC/mL	t(h)	D.O.	Ln(D.O.)	UFC/mL	
0	0.042		1	0.042	-3.170	2.83E+08		0		0		0	0		
1	0.116		1	0.116	-2.154	5.50E+08	0.053	1	0.053	-2.937		2	0.225	-1.492	3.92E+07
2	0.373		1	0.373	-0.986		0.140	1	0.14	-1.966		4	0.741	-0.300	2.34E+08
3	0.957		1	0.742	-0.298	9.17E+10	0.289	1	0.289	-1.241	1.49E+08	6	1.525	0.422	5.31E+08
4	1.066		1	1.066	0.064	4.37E+12	0.657	1	0.657	-0.420	3.26E+08	8	3.177	1.156	7.28E+08
5	0.686		2	1.372	0.316		0.543	2	1.086	0.083	4.20E+08	10	4.820	1.573	1.51E+09
6	0.704		2	1.408	0.342		0.853	2	1.706	0.534	8.75E+08	12	6.184	1.822	2.09E+09
7							0.918	2	1.836	0.608		14	6.690	1.901	2.15E+09
8							0.929	2	1.858	0.620		16	7.714	2.043	3.00E+09
9	0.698		2	1.396	0.334							18	8.105	2.092	3.43E+09
												20	7.721	2.044	
												22	7.975	2.076	
												24	7.818	2.056	



Los cálculos de UFC/mL son resultado de la cuantificación por triplicado de las colonias contenidas en 20 μ L de medio de cultivo.

Microorganismo	Fase log		Mitad de fase log (h)	D.O.	UFC/mL
	Inicia	Termina			
<i>Bacillus</i> spp.	t=0	t=4	2	0.373	6.09X10 ⁹
<i>Staphylococcus</i> spp.	t=0	t=6	4	0.657	3.08X10 ⁸
<i>Enterococcus</i> spp.	t=0	t=12	5	1.143	2.57X10 ⁸

Anexo 4. Análisis estadístico de Duncan

Ejemplo del análisis estadístico que se realizó a todos los resultados del análisis fisicoquímico con el fin de determinar diferencias significativas entre cada estrato. Resultados para el análisis de actividad acuosa.

Zona	a _w		
	M1	M2	M3
1	0.910	0.918	0.913
2	0.908	0.906	0.905
3	0.890	0.893	0.892
4	0.866	0.866	0.867
5	0.866	0.873	0.870

1º ordenar promedios de menor a mayor

ZONA	4	5	3	2	1
PROM	T.V	T.IV	T.III	T.II	T.I
	0.866	0.870	0.892	0.906	0.914

2º Cálculo de Sy

$$S_y = \text{raíz}(\text{MCE}/n)$$

Tratamiento o zona:	1	2	3	4	5
	0.910	0.908	0.890	0.866	0.866
	0.918	0.906	0.893	0.866	0.873
	0.913	0.905	0.892	0.867	0.870
suma trat=	2.741	2.719	2.675	2.599	2.609

T..= 13.343

Suma de cuadrados total= 11.875

T..*T../15= 11.869

SCtotal= 0.005

suma de cuadrados trat= 35.623

SCfac= 0.005

SCE= 0.00007

MCE= 0.000007

Sy= 0.0012

3º Rangos significantes. Lectura de tablas (Duncan, 1955)

$$r_{\alpha(p,f)} \quad \alpha = 0.05$$

p = de 2 hasta 5 tratamientos

f = gl(error) = 10

$$r_{0.05(2,10)} = 3.15$$

$$r_{0.05(3,10)} = 3.30$$

$$r_{0.05(4,10)} = 3.37$$

$$r_{0.05(5,10)} = 3.43$$

4º Rangos múltiples

$$R_p = r_{\alpha(p,f)} \times S_y$$

$$R_2 = 0.0037$$

$$R_3 = 0.0038$$

$$R_4 = 0.0039$$

$$R_5 = 0.0040$$

5º Construcción de la matriz de diferencia

	T.V	T.IV	T.III	T.II	T.I	
T.V	***	0.004	0.026	0.040	0.048	vs R5
T.IV		***	0.022	0.036	0.044	vs R4
T.III			***	0.014	0.022	vs R3
T.II				***	0.008	vs R2
T.I					***	

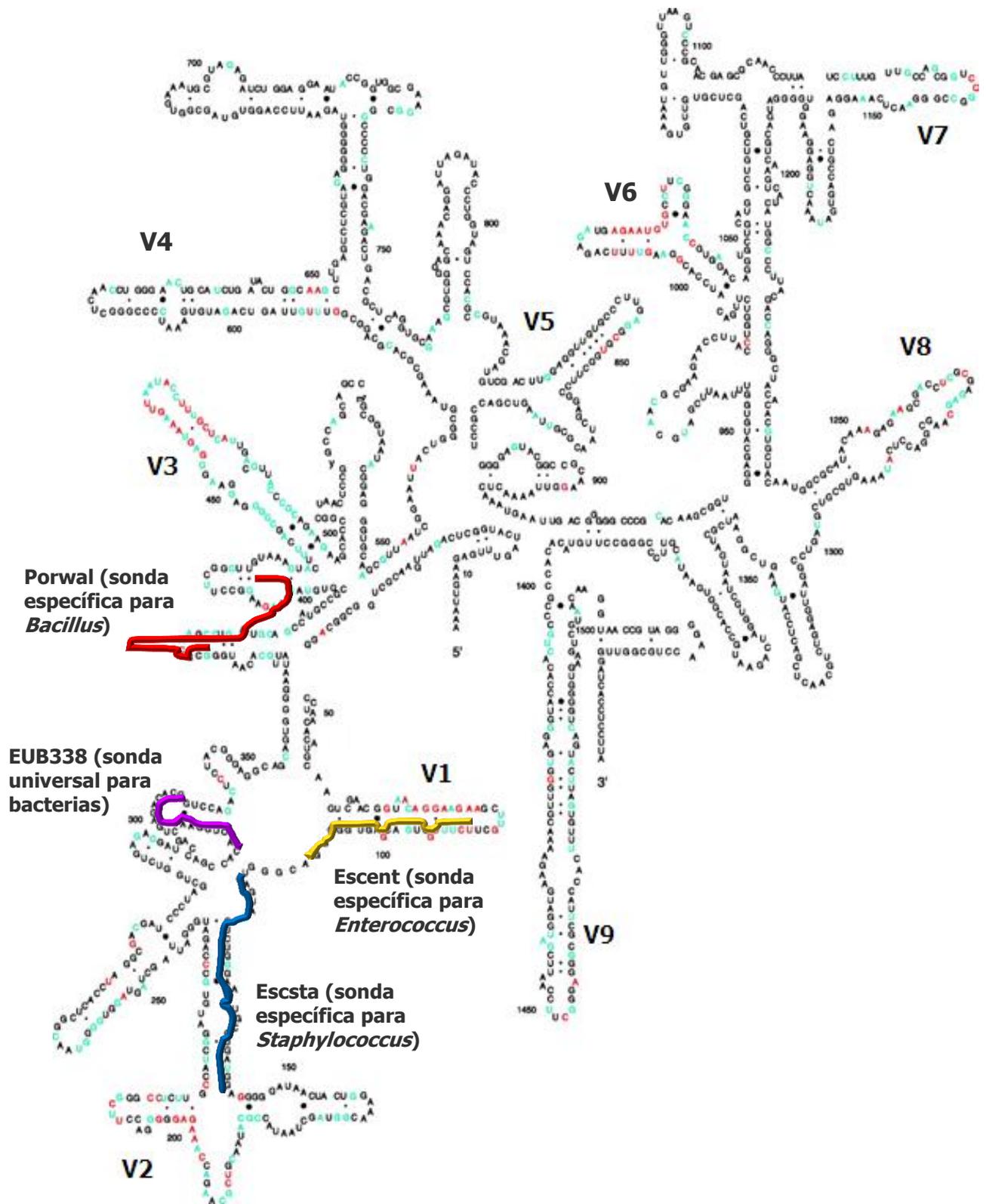
Comparando:

Contra R5:	0.048 > R5	entonces:	T.I ≠ T.V
Contra R4:	0.040 > R4	entonces:	T.II ≠ T.V
	0.044 > R4	entonces:	T.I ≠ T.IV
Contra R3:	0.026 > R3	entonces:	T.III ≠ T.V
	0.036 > R3	entonces:	T.II ≠ T.IV
	0.022 > R3	entonces:	T.I ≠ T.III
Contra R2:	0.004 > R2	entonces:	T.IV ≠ T.V
	0.022 > R2	entonces:	T.III ≠ T.IV
	0.014 > R2	entonces:	T.II ≠ T.III
	0.008 > R2	entonces:	T.I ≠ T.II

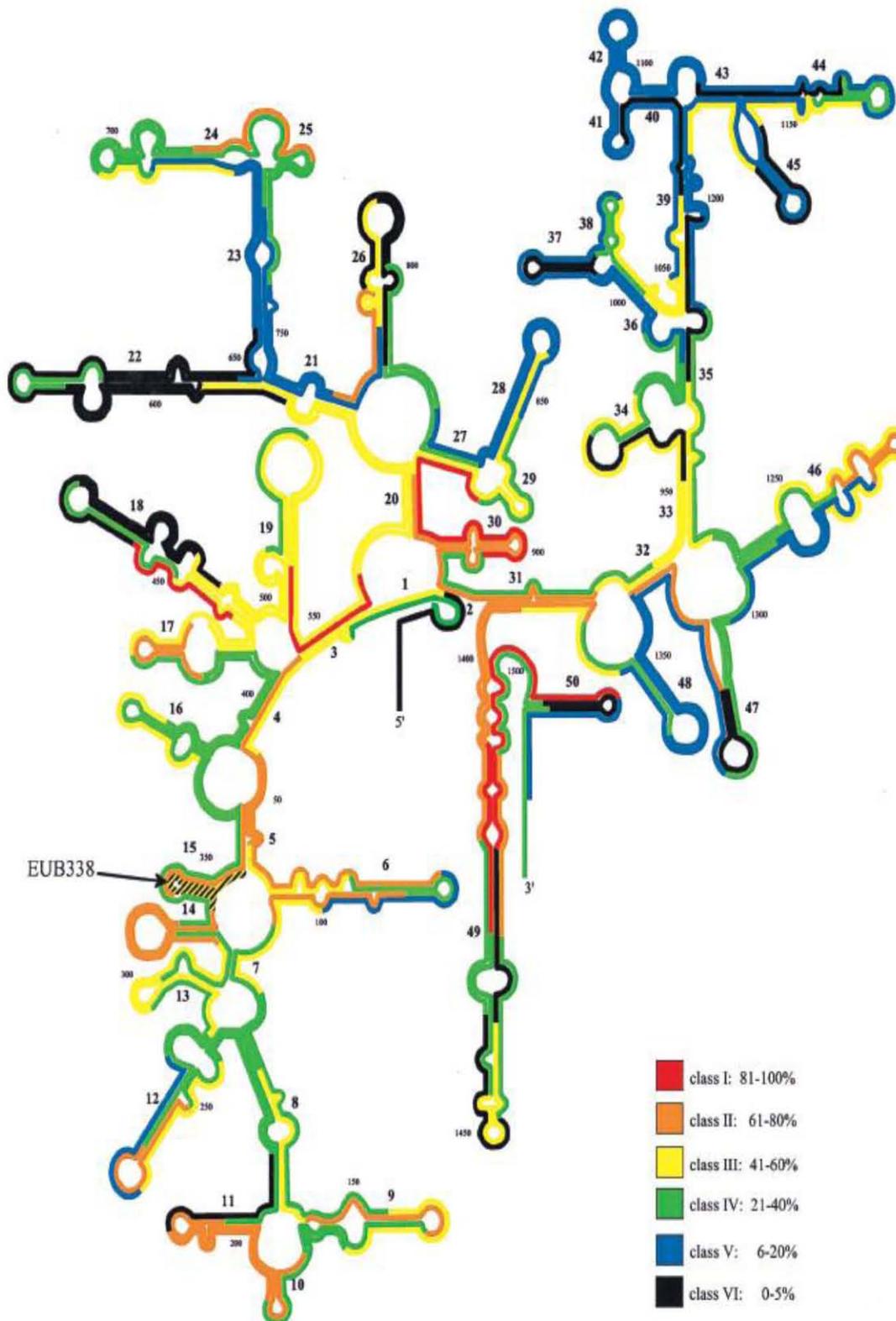
6º Conclusión:

El a_w en cada una de las zonas de queso Cotija es estadísticamente diferente con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$).

Anexo 5. Estructura del gen ribosomal 16S y zonas de hibridación de las sondas



Anexo 6. Accesibilidad en zonas de hibridación del gen ribosomal 16S (76).



Anexo 7. Controles de autofluorescencia

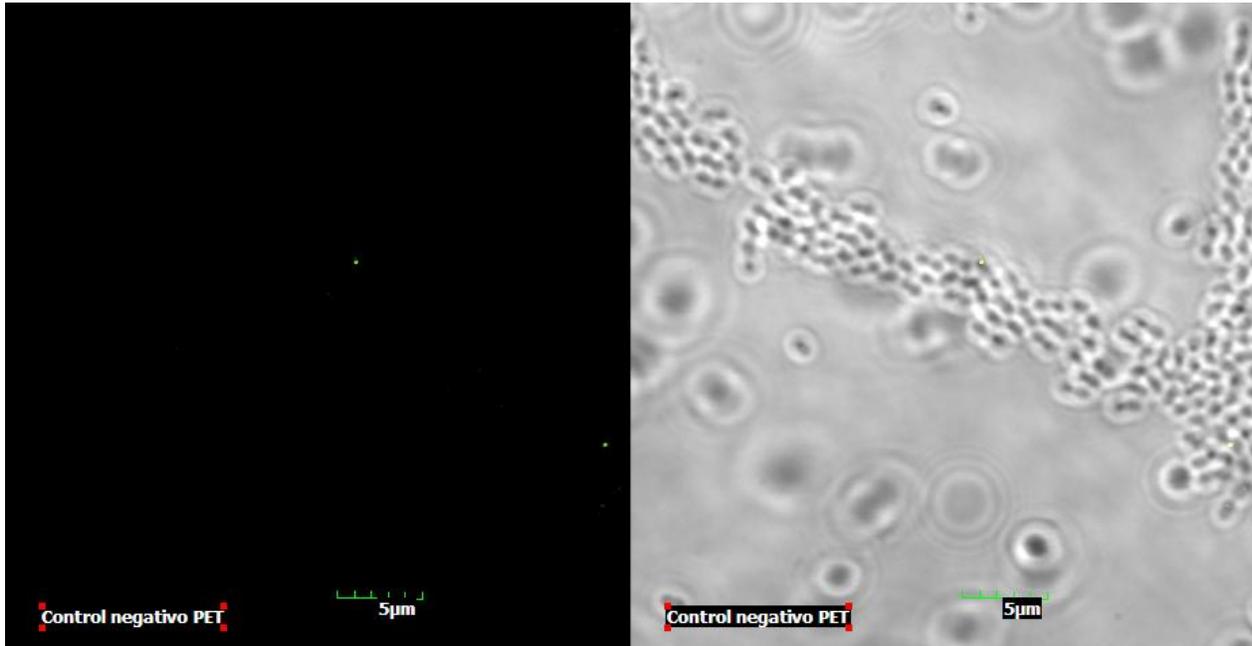


Figura A7.1. Ajuste de eliminación de señal de autofluorescencia en *Enterococcus* a la longitud de onda de máxima excitación del fluoróforo PET.

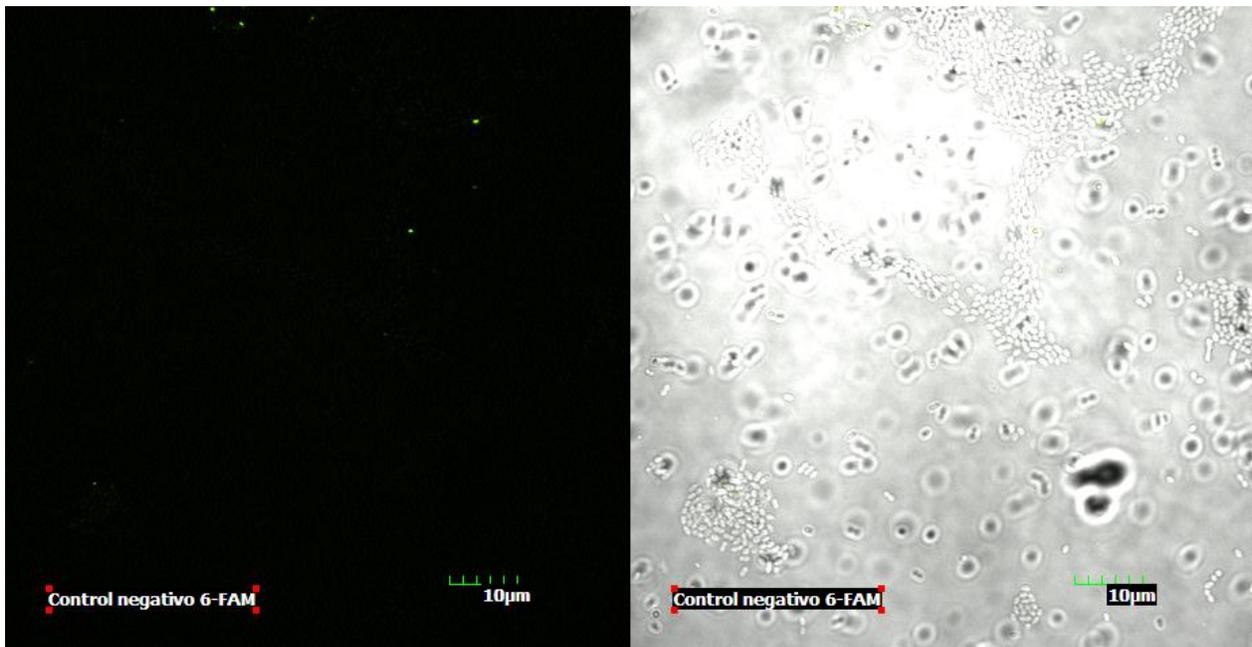


Figura A7.2. Ajuste de eliminación de señal de autofluorescencia en *Staphylococcus* a la longitud de onda de máxima excitación del fluoróforo 6-FAM.

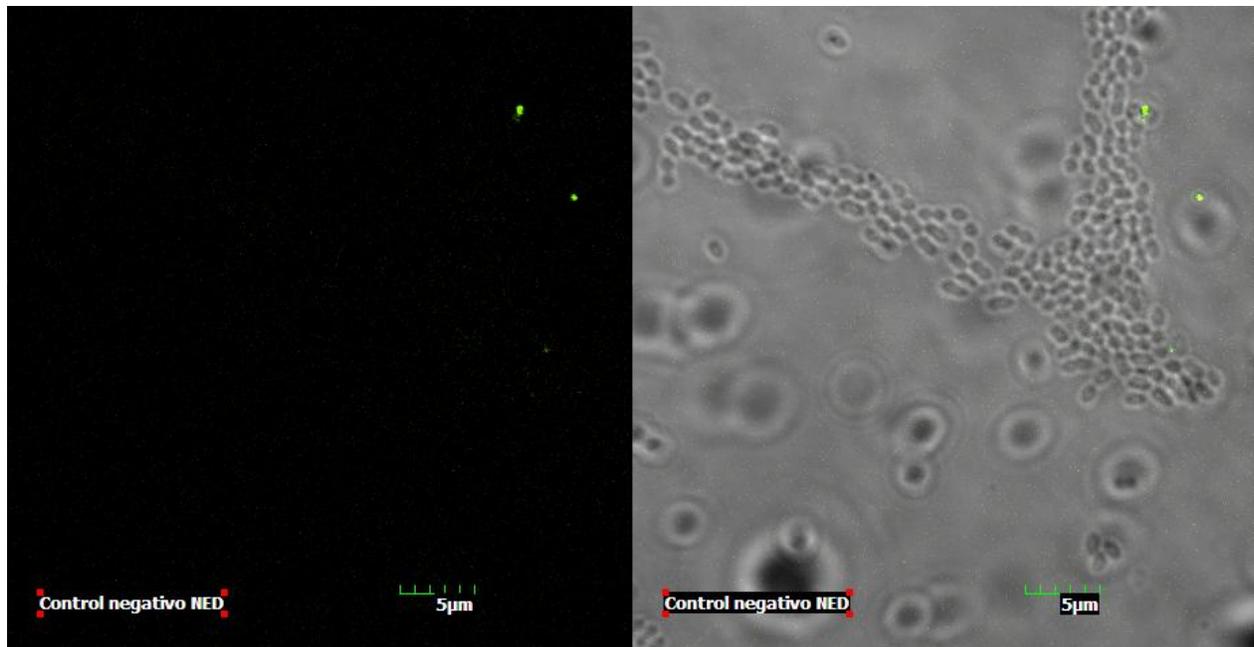


Figura A7.1. Ajuste de eliminación de señal de autofluorescencia en *Enterococcus* a la longitud de onda de máxima excitación del fluoróforo NED.

Anexo 8. Controles negativos de hibridaciones cruzadas

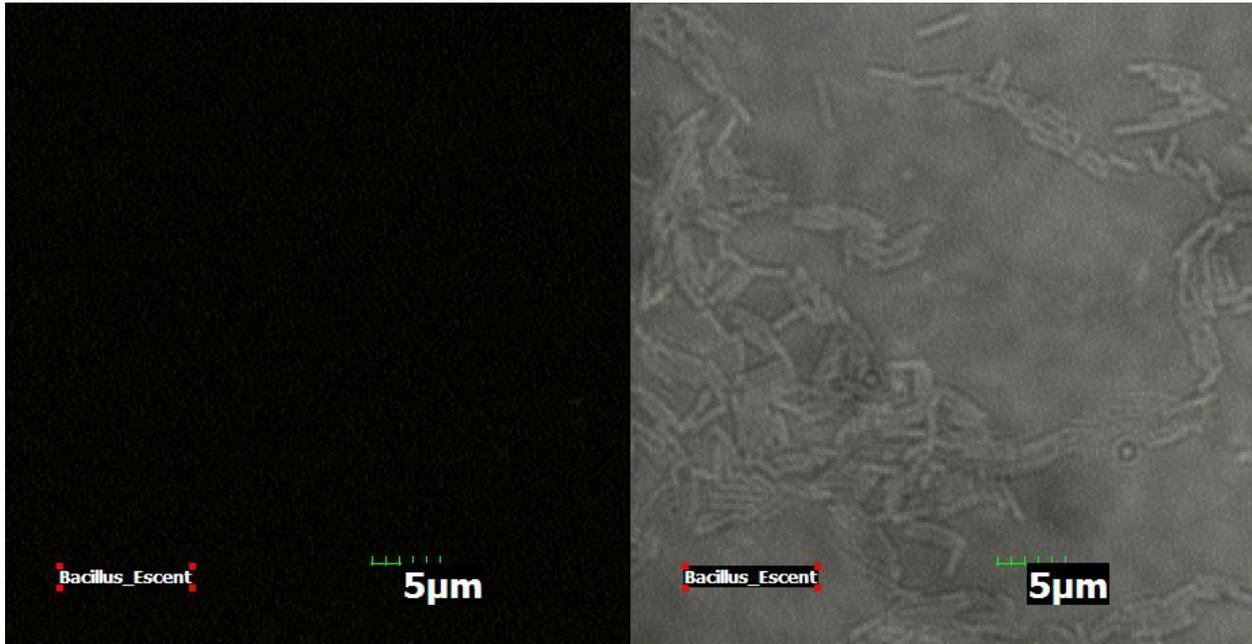


Figura A8.1. Ejemplo de hibridación negativa de la sonda específica para *Enterococcus* (Escent) en *Bacillus*. Las condiciones de hibridación fueron 10% de formamida en el buffer.

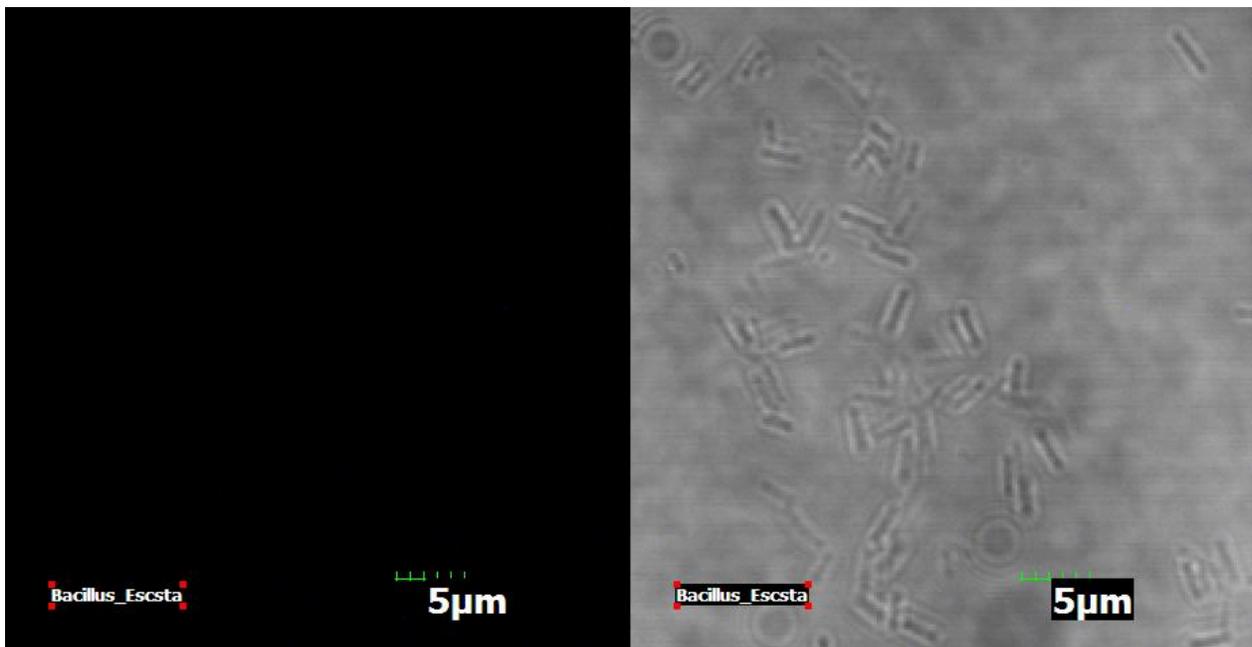


Figura A8.2. Ejemplo de hibridación negativa de la sonda específica para *Staphylococcus* (Escsta) en *Bacillus*. Las condiciones de hibridación fueron 25% de formamida en el buffer.

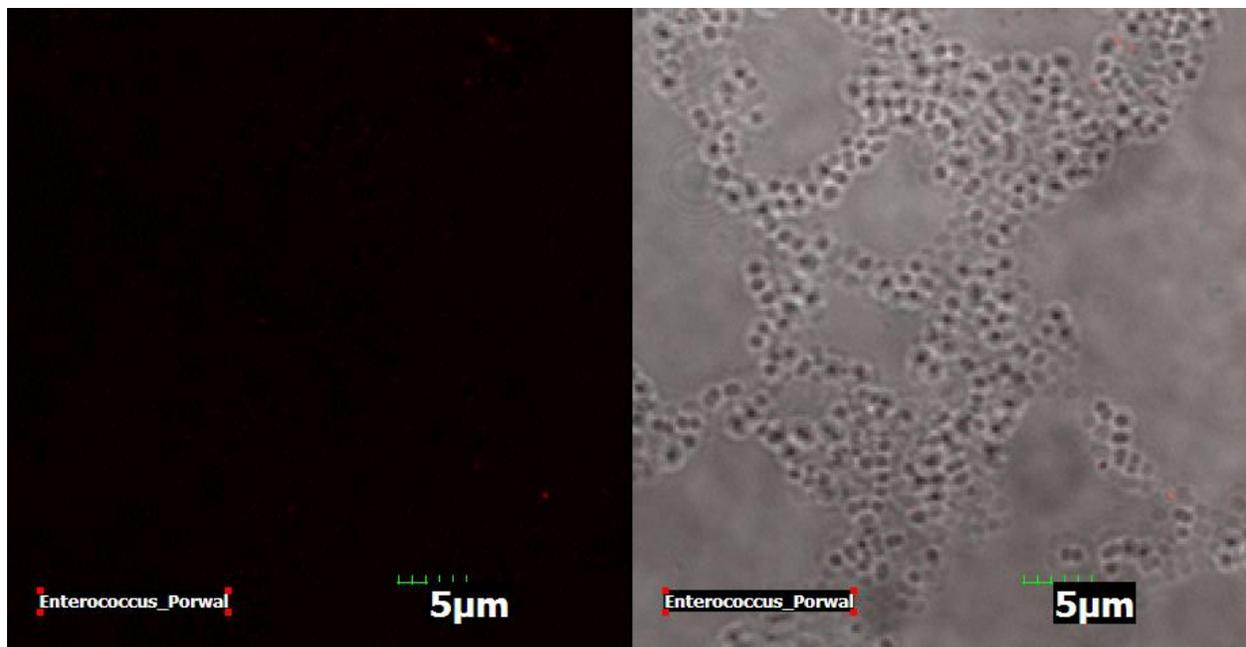


Figura A8.3. Ejemplo de hibridación negativa de la sonda específica para *Bacillus* (Porwal) en *Enterococcus*. Las condiciones de hibridación fueron 0% de formamida en el buffer.

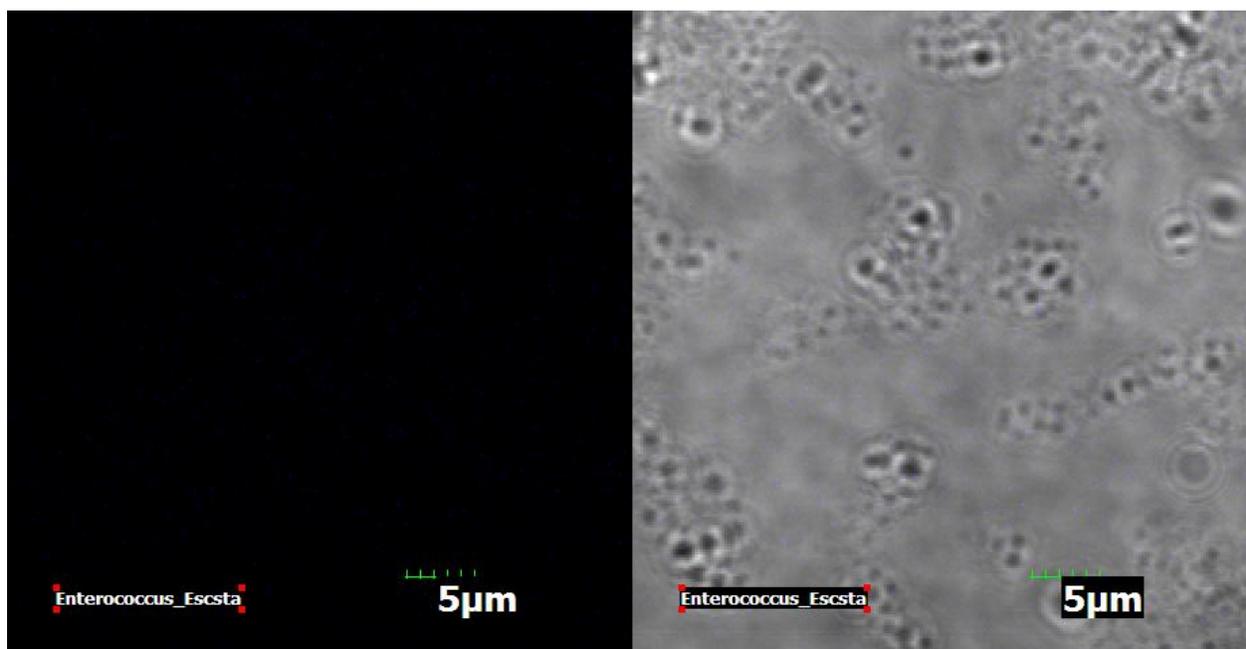


Figura A8.4. Ejemplo de hibridación negativa de la sonda específica para *Staphylococcus* (Escsta) en *Enterococcus*. Las condiciones de hibridación fueron 25% de formamida en el buffer.

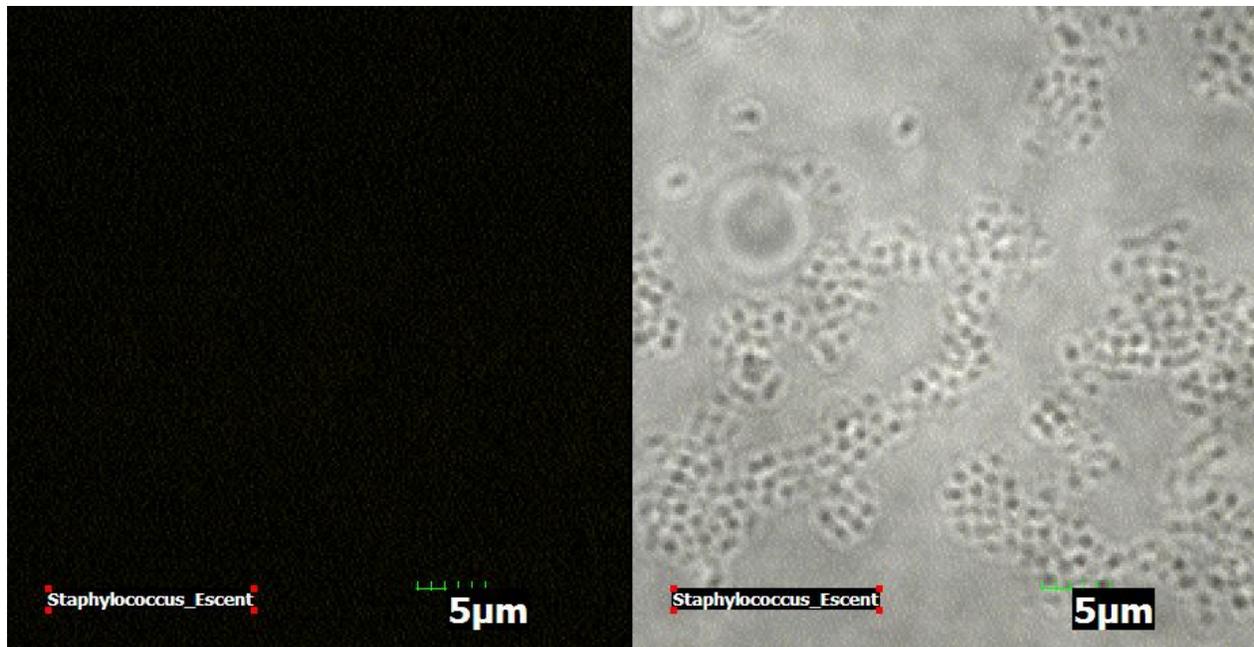


Figura A8.5. Ejemplo de hibridación negativa de la sonda específica para *Enterococcus* (Escent) en *Staphylococcus*. Las condiciones de hibridación fueron 10% de formamida en el buffer.

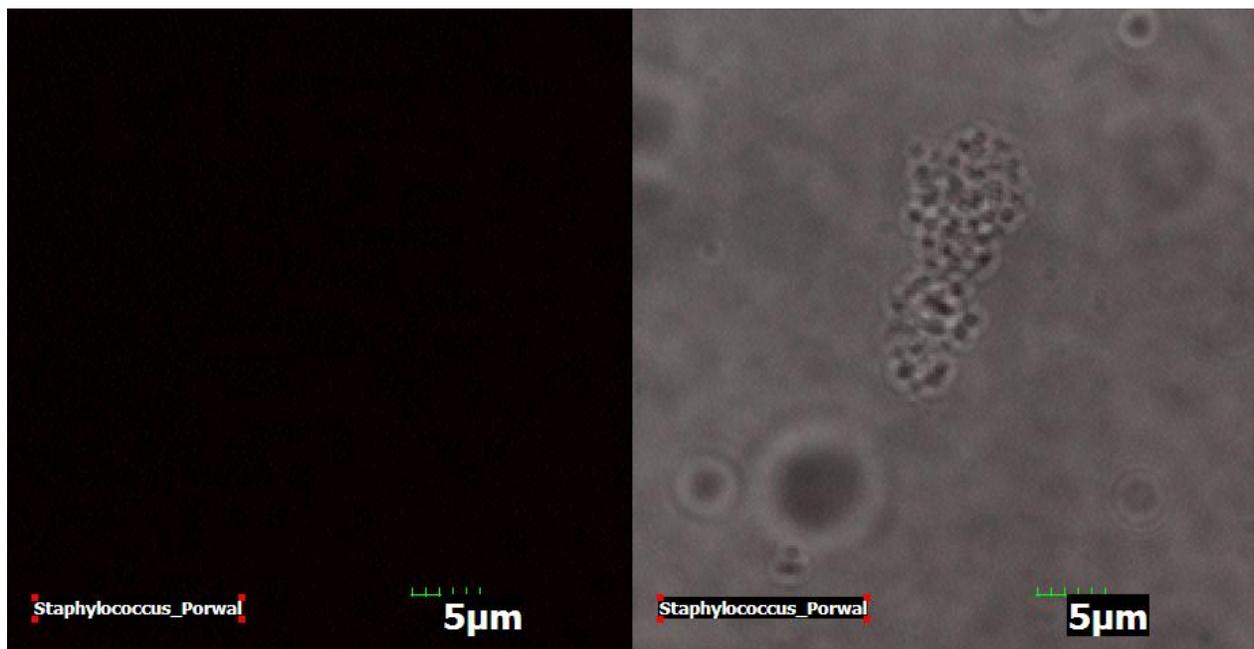


Figura A8.6. Ejemplo de hibridación negativa de la sonda específica para *Bacillus* (Porwal) en *Staphylococcus*. Las condiciones de hibridación fueron 0% de formamida en el buffer.

Referencias

- 1 Bravo-Mendoza, A. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas de queso Cotija. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- 2 Olvera-García, M. (2010). Efecto del medio de cultivo en la producción de compuestos antibacterianos por *Enterococcus sp.* Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- 3 Hernández-Briones, V. (2007). Queso Cotija: Estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- 4 Eck, A. El queso. Ediciones Omega. Barcelona, España, 1990.
- 5 Saurel, R. (2004). Modeling of French Emmental cheese water activity during salting and ripening periods. *Journal of Food Engineering*. 63:163-170.
- 6 Fox, P. Guinee, T. Cogan, T. Mc Sweeney, P. Fundamentals of Cheese Science. An Aspen publication, USA, 2000.
- 7 Marcos, A. Water Activity in Cheese in Relation to Composition, Stability and Safety. 2nd edition. Chapman & Hall. London, England. 1993.
- 8 Meseguer, I. (2004). Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado a la biotecnología. Ciencia e investigación. 2:13-17.
- 9 Beresford, T. Fitzsimons, N. Brennan, N. Cogan, T. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*. 11:259-274.
- 10 Roginski, H. Encyclopedia of dairy sciences, Academic Press. London, UK. 2003.
- 11 Topcu, A. McKinnon, I. McSweeney, P. (2008). Measurement of the oxidation–reduction potential of Cheddar cheese. *Journal of Food Science*. 73:C198-C203.
- 12 Abraham, S. Cachon, R. Colas, B. Feron, G. De Coninck, J. (2007). Eh and pH gradients in Camembert cheese during ripening: Measurements using microelectrodes and correlations with texture. *International Dairy Journal*, 17 954–960.
- 13 Rivas, C. & Mota, M. Temas de bacteriología y virología médica. Cap. 21. Bacterias anaerobias. 3a Edición Montevideo, Oficina del libro FEFMUR, 2008, Pag. 335-380.
- 14 Lucey, J. & Fox, P. (1993) Importance of Calcium and Phosphate in Cheese Manufacture: A Review. *Journal of Dairy Science*. 76(6):1714-1724.
- 15 Emmons, D. Ernstrom, C. Lacroix, C. Verret, P. Yield Formulae: Factors affecting the yield of cheese. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica, 1991.
- 16 Inda, C. Optimización de rendimiento y aseguramiento de inocuidad en la industria de la quesería. Proyecto de Calidad y Productividad en la Pequeña y Mediana Empresa. 2000, Coahuila, México.

-
- 17 Walstra, P. The Syneresis of Curd. Chapter 5: Cheese: chemistry, physics and microbiology. Volume 1. General Aspects. 2nd Edition, Chapman & Hall. London, UK. 1993.
- 18 López, R. & Ramos, M. (1992). Revisión: El caseinomacropéptido bovino. I. Características físico-químicas y actividad biológica. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 32(6):575-588.
- 19 Álvarez, B. R., Barragán, L. E., Chombo, M. P. (2005) Reglas de uso. Marca colectiva Queso Cotija Región de Origen. México.
- 20 Van Hekken, D. & Thompson, M. (1992). Application of phast system to the resolution of bovine milk proteins on urea-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*. 75(5):1204-1210.
- 21 Beynom, R. & Bond, J. proteolytic Enzymes: A Practical Aproach. Academic Press. Oxford, Inglaterra, 1989.
- 22 Fox, P. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*. 72:1379-1400.
- 23 Marilley, L. & Casey, M. (2003). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of product strains. *International Journal of food Microbiology* (XX) 1-21.
- 24 Pouch, D. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th edition. American Public Health Association. 2001, USA.
- 25 Gasson, M. & Vos, M. Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Ed. Blackie Academic and Professional, Londres, Inglaterra, 1994.
- 26 García-Saturnino, V. (2006). Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- 27 Hernández-Mejía, N. (2007). Identificación de bacterias proteolíticas aisladas del queso Cotija, un estudio microbiológico y fisicoquímico. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- 28 Zúñiga-Bustos, A. (2009). Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por métodos moleculares. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- 29 Estrada-Hernández, C. (2009). Análisis microbiológico de queso Cotija identificación de microorganismos patógenos mediante la técnica de PCR punto final. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- 30 Cortés-Díaz, L. (2009). Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa en la búsqueda de bacterias ácido lácticas en un queso artesanal mexicano. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- 31 Gómez-Castelo, B. (2010). Identificación de bacterias halófilas presentes en queso Cotija por métodos independientes de cultivo. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- 32 Singleton, P. Bacterias en biología, biotecnología y medicina. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 2004.

-
- 33 Rodriguez, J.M. Consecuencias higiénicas de la alteración de los alimentos. Departamento de nutrición, bromatología y tecnología de los alimentos. Facultad de veterinaria. Universidad complutense de Madrid, España. s/a.
- 34 Figueroa, G. Navarrete, P. Caro, M. Troncoso, M. Faúndez, G. (2002). Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. *Revista Médica de Chile*. 130:859-864.
- 35 Bennett, R. (1992). The biomolecular temperament of Staphylococcal enterotoxin in thermally processed foods. *J AOAC Int*. 75:6-12.
- 36 Mims, C. Playfair, J. Roitt, I. Wakelin, D. Microbiología Médica, 2ª edición. Mosby, Harcourt Brace. Barcelona, España. 1999.
- 37 DeVuyst, L. & Vandamme, E. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (Eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, 1994.
- 38 Hernández-Ramírez, A. (2009). Evaluación del potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* para su uso en un alimento funcional. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. México.
- 39 Ishikawa, M. Nakajima, K. Yanagi, M. Yamamoto, Y. Yamasato, K. (2003). *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:711–720.
- 40 Toffin, L. Zink, K. Kato, C. Pignet, P. Bidault, A. Bienvenu, N. Birrien, JL. Prieur, D. (2005). *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deep sub-seafloor sediment of the Nankai Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55:345–351.
- 41 Shewmaker, P. Steigerwalt, A. Morey, R. Carvalho, M. Elliott, J. Joyce, K. Barrett, T. Teixeira, L. Facklam, R. (2004). *Vagococcus carniphilus* sp. nov., isolated from ground beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54:1505-1510.
- 42 Lawson, P. Foster, G. Falsen, E. Ohlén, M. Collins, M. (1999). *Vagococcus lutrae* sp. nov., isolated from the common otter (*Lutra lutra*). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49:1251-1254.
- 43 Lawson, P. Falsen, E. Cotta, M. Whitehead, T. (2007). *Vagococcus elongatus* sp. nov., isolated from a swine-manure storage pit. *Internationa Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57:751-754.
- 44 Díaz, G. & Wachter, C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 45:30-40.
- 45 Amann, R. & Kühn, M. (1998). *In situ* methods for assessment of microorganisms and their activities. *Current Opinion in Microbiology*. 1:352-358.
- 46 Amann, R. Ludwig, W. Schleifer, K. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*. 59:143-169.
- 47 DeLong, E. Wickham, G. Pace, N. (1989). Phylogenetic stain: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science*, 243:1360-1363.

-
- 48 Amann, R. Fuchs, B. Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*. 12:231-236.
- 49 Amann, R. Krumholz, L. Stahl, D. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 172:762-770.
- 50 Watson, J. Baker, T. Bell, S. Gann, A. Levine, M. Losick, R. Molecular Biology of the Gene. 6th Edition, Pearson. New York, USA. 2008.
- 51 Bottari, B. Ercolini, D. Gatti, M. Neviani, E. (2006). Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 73:485-494.
- 52 Moter, A. & Göbel, U. (2000). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 41:85-112.
- 53 Spear, R. Li, S. Nordheim, E. Andrews, J. (1999). Quantitative imaging and statistical analysis of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of *Aureobasidium pillulans*. *Journal of Microbiological Methods*. 35:101-110.
- 54 Invitrogen. Molecular probes handbook, a guide to fluorescent probes and labeling technologies, 11th edition, Softcover, 2010. Cat No H-37127.
- 55 Cullander, C. (1994). Imaging in the far-red electronic light microscopy: requirements and limitations. *Journal of Microscopy*, 176: 281-268.
- 56 Chattopadhyay, P. Price, D. Harper, T. Betts, M. Yu, J. Gostick, E. Perfetto, S. Goepfert, P. Koup, R. De Rosa, S. Bruchez, M. Roederer, M. (2006). Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromic flow cytometry. *Nat Med*. 12: 972:977.
- 57 Marras, S. (2008). Interactive fluorophore and quencher pairs for labeling fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Molecular Biotechnology*. 38:247–255.
- 58 Claxton, N. Fellers, T. Davidson, M. (s/año). Laser scanning confocal microscopy. Department of Optical Microscopy and Digital Imaging, National High Magnetic Field Laboratory, The Florida State University, Florida USA.
- 59 Nielsen, S. Food Analysis Laboratory Manual. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA. 2003.
- 60 Norma Mexicana NMX-F-099-1970. Método de prueba para la determinación de pH en quesos procesados. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.
- 61 Norma Mexicana NMX-F-206-1986. Determinación de acidez expresada como ácido láctico en leche en polvo. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- 62 Kindstedt, P. & Kosikowski, F. (1985). Improved complexometric determination of calcium in cheese. *Journal of Dairy Science*. 68:806-809.
- 63 González-Tahuilán, N. (2008). Análisis de los péptidos liberados durante la maduración de queso Cotija. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.

-
- 64 A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17a Edition, 2000. Chapter 12 part 12.1.07, 965.49.
- 65 Alcántara-Sol, M. (2009). Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de *Bacillus pumilus* aislado de un producto lácteo tradicional mexicano. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. México.
- 66 Blasco, L. Ferrer, S. Pardo, I. (2003). Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 225:115-123.
- 67 Vollmer, W. Joris, B. Charlier, P. Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *Federation of European Microbial Societies*. 32:259-286.
- 68 Rojas, R. Narváez, J. Zamudio, M. Mena, E. (2008) A simple sílica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Molecular Biotechnology*. 40:13-17
- 69 López, J. s/año. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Disponible por: <http://201.131.19.30/Estudios/lacteos/Caracterizacion%20del%20Queso%20Chihuahua.pdf>
Última fecha de acceso 01 de Junio de 2011.
- 70 Van Hekken, D. & Thompson, M. (1992). Application of PhastSystem to the resolution of bovine milk proteins on urea-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*. 75(5):1204-1210.
- 71 Ruano-ortíz, J (2008). Cuantificación de isómeros trans de ácidos grasos en leche cruda de la planta de lácteos de Zamorano por cromatografía de gases. Tesis de licenciatura. Universidad de Honduras. Programa de Ingeniería en Agroindustria. Honduras.
- 72 Case, R. Boucher, Y. Dahllöf, I. Holmström, C. Doolittle, F. Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(1):278–288.
- 73 Jansen, G. Mooibroek, M. Idema, J. Harmsen, H. Welling, G. Degener, J. (2000). Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(2):814–817
- 74 Williams, A. & Collins, M. (1992). Genus- and species-specific oligonucleotide probes derived from 16s rRNA for the identification of vagococci. *Letters in Applied Microbiology*. 14:17-21.
- 75 Porwal, S. Lal, S. Cheema, S. Kalia, V. (2009). Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in *Bacillus*. *PLoS ONE* 4(2): e4438.doi:10.1371/journal.pone.0004438.
- 76 Fuchs, B. Glockner, F. Wulf, J. Amann, R. (2000). Unlabeled helper oligonucleotides increased the *in situ* accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(8):3603-3617.
- 77 Oren, A. (2004). Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 359:623–638
- 78 Hugenholtz, P. Goebel, B. Pace, N. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180:4765–4774.

-
- 79 Ward, D. (1998). A natural species concept for prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:271–277.
- 80 Dojka, M. Harris, J. Pace, N. (2000). Expanding the known diversity distribution of an uncultured phylogenetic division of Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1617– 1621.
- 81 DeLong, E. & Pace, N. (2001). Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst. Biol.* 50:470–478.
- 82 Giovannoni, S. Britschgi, T. Moyer, C. Field, K. (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature.* 345:60–63.
- 83 Morris, R. Rappé, M. Connon, S. Vergin, K. Siebold, W. Carlson, C. Giovannoni, S. (2002). SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature.* 420:806–810.