

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS HALÓFILAS
 A PARTIR DE SAL DE GRANO

TESIS que para obtener el título de **QUÍMICA DE ALIMENTOS**

Presenta:

Beatriz Elizabeth Avilés Plazola



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente: Aurora Irma Ortega Ávila

Vocal: Martha Giles Gómez

Secretario: Maricarmen Quirasco Baruch

1er. suplente: Norma Angélica Camacho de la Rosa

2do. suplente: Aleida Mina Cetina

Este proyecto de tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch en el Laboratorio 312, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM, México D.F.
Patrocinada por el proyecto PAPIIT IN230511.

Asesor de tema

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Supervisor técnico

Dra. Carolina Peña Montes

Sustentante

Beatriz Elizabeth Avilés Plazola

CONTENIDO

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	3
III.	ANTECEDENTES	5
	3.1. Cloruro de sodio	5
	3.2. Producción de cloruro de sodio en México	5
	3.2.1. Sal de Grano de Cuyutlán, Colima (SCC)	8
	3.2.2. Sal de Grano de Cd. Obregón, Sonora (SMC)	9
	3.3. Microorganismos halófilos	11
	3.3.1. Microorganismos halófilos en ecosistemas marinos	12
	3.3.2. Aplicaciones de microorganismos halófilos	13
	3.3.3. Queso Cotija	15
	3.4. Métodos microbiológicos dependientes de cultivo	17
	3.5. Métodos microbiológicos independientes de cultivo	18
	3.5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	18
	3.5.2. Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)	21
IV.	JUSTIFICACIÓN	23
V.	HIPÓTESIS	24
VI.	OBJETIVOS	24
VII.	METODOLOGÍA REPRESENTADA EN DIAGRAMA DE FLUJO	25
VIII.	METODOLOGÍA	25
	8.1. Muestras de sal de grano	25
	8.2. Preparación de medios de cultivo	26
	8.3. Análisis microbiológico con métodos tradicionales	27
	8.3.1. Enriquecimiento de microorganismos presentes en la sal	27
	8.3.2. Cultivo de microorganismos en medio sólido	28
	8.3.3. Caracterización, aislamiento y purificación de colonias	29
	8.3.4. Recuperación de paquete celular	29

9.3.3. DGGE (Electroforesis en Gel con un Gradiente Desnaturalizante)	56
9.3.3.1. Análisis de geles de DGGE	68
9.3.3.2. Análisis de selección de bandas e identificación molecular	62
X. CONCLUSIONES	80
XI. PERSPECTIVAS	81
XII. ANEXOS	82
ANEXO I	
Conservación de colonias a largo plazo por congelación	82
ANEXO II	
Composición de soluciones para geles de DGGE	83
ANEXO III	
Tinción de geles de DGGE con plata	85
ANEXO IV	
Método de extracción de ADN de banda de DGGE y precipitación con disolventes	86
ANEXO V	
Purificación de ADN (System Applied Science, Roche™)	87
ANEXO VI	
Caracterización colonial (Facultad de Química, UNAM, 2008)	89
ANEXO VII	
Cuantificación de ADN extraído de las muestras en diferentes medios	91
ANEXO VIII	
Cuantificación de ADN de los productos de la PCR	93
ANEXO IX	
Secuencia de la región V3 de 16S de ADNr	95
XIII. BIBLIOGRAFÍA	101

I. RESUMEN

Las bacterias halófilas son microorganismos que han podido desarrollar diversas estrategias para mantener su estructura y función celular para soportar ambientes de alta presión osmótica ocasionada por la presencia de NaCl. Así mismo, se han reportado hallazgos que indican que participan en la fermentación de alimentos artesanales y su presencia se debe a una inoculación de ellos en la etapa de salado. Particularmente, nuestro grupo de trabajo ha estudiado la microbiota bacteriana del queso Cotija y el análisis con métodos moleculares indican la presencia de bacterias de este tipo.

El objetivo de este trabajo fue el aislamiento e identificación de bacterias halófilas de dos muestras de sal de diferente procedencia geográfica en México. Una de las muestras es materia prima de la fabricación del queso Cotija (**SCC**), proveniente de Cuyutlán, Colima y se decidió compararla con muestra comercial de Cd. Obregón, Sonora (**SMC**), utilizando métodos microbiológicos tradicionales y moleculares.

La metodología de este trabajo consistió en enriquecer las dos muestras de sal en cuatro diferentes medios de cultivo selectivos para bacterias halófilas. Se seleccionaron al azar 7 colonias de cada uno de los medios de cultivo y se realizó la extracción de su ADN. Con el fin de diferenciar a las colonias aisladas, se utilizó un método basado en el análisis de su información genética. Para lo cual se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con cebadores universales para la región V3 del ARNr 16S de cada colonia aislada. Posteriormente se efectuó el análisis de los fragmentos obtenidos de la PCR, utilizando una electroforesis en gel con un gradiente desnaturante (DGGE). Por último se seleccionaron los patrones de bandeo y se eligieron bandas para su secuenciación comparándolas mediante BLAST con la base de datos del GenBank. Con el fin de conocer la identidad del microorganismo aislado, su identidad se confirmó mediante agrupamiento utilizando método de Neighbor-Joining.

Los resultados mostraron que todos los aislados fueron bacilos Gram-positivos y sus colonias presentaron morfologías similares en los medios utilizados.

En los perfiles de DGGE todos los microorganismos mostraron el fenómeno de multiple bandeo del gen ribosomal 16S. En general, en las dos muestras de sal se identificaron a microorganismos como *Bacillus licheniformis* y *Virgibacillus dokdonensis*, este último se halló en todos los medios de cultivo. *Bacillus flexus* se encontró exclusivamente en la muestra **SCC**, mientras que *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium* y *Virgibacillus halodenitrificans*, se hallaron sólo en la muestra **SMC**.

La implementación de un estudio polifásico resultó útil para conocer la naturaleza de las muestras y la agrupación de los aislados. A través del análisis de las bandas obtenidas por DGGE, se pueden concluir que las dos muestras de sal de diferente origen geográfico tienen diferente composición bacteriana, aunque presentan algunos microorganismos en común. Por lo anterior se infiere que entonces el tipo de sal puede influir en la microbiota halófila bacteriana que participa en la fermentación del queso Cotija. Por lo que será de interés, realizar estudios correspondientes para aislar bacterias utilizando medios de cultivo específicos para microorganismos halófilos con el fin de tener una colección más completa de microorganismos presentes en dicho producto.



II. INTRODUCCIÓN

El cloruro de sodio, es un aditivo alimentario muy importante que se ha utilizado generalmente como sazonador y conservador en la preparación de alimentos tanto en el hogar como en la industria.

Históricamente la sal ha participado en la producción de alimentos como conservador; sin embargo, hoy en día algunos autores hacen énfasis en que la adición de sal es una posible fuente de microorganismos que pueden participar en la maduración de alimentos fermentados como es en la salsa de soya japonesa o indonesia, camarón o cangrejo fermentados, y en algunos quesos maduros, como el queso Cotija, entre otros (Casillas, 2013; García-Saturnino, *et al.*, 2010; Gómez, 2010; Kobayashi, *et al.*, 2004; Margesin, *et al.*, 2001; Oren, 2009).

El queso Cotija es un producto lácteo artesanal que se produce en México en la región de JALMICH. Con el fin de la estandarización y la protección del mismo, los productores del queso se basan en las “Reglas de uso” para su manufactura, ya que actualmente se encuentra en proceso de obtener su Denominación de Origen. De acuerdo a estas reglas, la sal que es utilizada debe de ser sal de grano obtenida de forma artesanal en el estado de Colima.

Este trabajo surge por el interés de analizar microbiológicamente la sal de grano utilizada en la elaboración del queso Cotija, ya que estudios previos en el grupo de trabajo de la microbiota presente en el queso, han arrojado resultados interesantes sobre la contribución microbiológica de la sal sobre él.

Con estos antecedentes, se realizó una comparación de la microbiota halófila presente en la muestra de sal de grano procedente de Colima, con otra muestra de sal de diferente origen geográfico (Cd. Obregón, Sonora), con el fin de conocer las posibles diferencias en la composición microbiana de dichas muestras.

Este estudio tiene por objeto aislar e identificar bacterias halófilas de las dos muestras de sal mexicana implementando métodos dependientes de cultivo para obtener una visión más detallada y precisa de la estructura de dichas comunidades microbianas.

Los métodos dependientes de cultivo consistieron en aislar y cultivar bacterias halófilas en medios de cultivo selectivos, reportados bibliográficamente, para microorganismos provenientes de ecosistemas marinos. Posteriormente, la selección de colonias se realizó con base en las diferencias morfológicas coloniales de cada medio.

Por último, se utilizó la técnica de PCR-DGGE con el propósito de comparar y obtener un criterio de selección de los patrones de bandeo de los geles de poliacrilamida, para su posterior secuenciación e identificación de la microbiota aislada de las muestras de sal de grano.



III. ANTECEDENTES

3.1. Cloruro de Sodio

Históricamente la utilización de la sal (NaCl) en la industria alimentaria ha tenido una gran relevancia a nivel mundial, ya que su ingestión es un hecho tan cotidiano, que ha jugado un papel importante en la civilización humana. La primera función que tiene el cloruro de sodio es nutrimental, ya que es fundamental para llevar a cabo reacciones fisiológicas en el cuerpo humano; además, se ha sido utilizado para proporcionar o intensificar sabores en los alimentos. Por otro lado, se ha utilizado para la conservación de alimentos, junto con otros métodos clásicos como es la deshidratación y la fermentación (Frazier, *et al.*, 2003.).

3.2. Producción de cloruro de sodio en México

En México la sal destinada para consumo humano es producida bajo las especificaciones sanitarias descritas en la Norma Oficial Mexicana NOM-040-SSA1-1993, Productos y servicios. Sal yodada y sal yodada fluorizada. Esta norma se basa en la del Codex STAN 150-1985 Sal de Calidad alimentaria.

Esta norma define como sal al producto constituido principalmente por cloruro de sodio que proviene exclusivamente de fuentes naturales. Se presenta en forma de cristales incoloros, solubles en agua y de sabor salado. Especifica que toda la sal para consumo debe contener en base seca y sin ningún aditivo, entre 97.5-98.6% de cloruro de sodio. Establece que puede tener una humedad máxima de 3% y con 0.5% de residuos insolubles en agua; además, debe de ser adicionada con yodo y flúor, previo a su comercialización. En la **Tabla 1** se presentan las cantidades de yodo y flúor que se deben adicionar de acuerdo a la NOM-040-SSA1-1993.

Tabla 1. Especificaciones de adición de Yodo y Flúor a la sal para consumo humano (NOM-040-SSA1-1993).

YODO [Yodato o yoduro de sodio o potasio]	FLÚOR [Fluoruro de sodio o potasio]
30± 10 mg/kg sal	200-250 mg/kg sal

Cabe mencionar que la yodación en la sal comestible, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para la niñez (UNICEF), la consideran una medida de mayor cobertura, menos costosa y de gran eficiencia en el mundo para la prevención de enfermedades por deficiencia de yodo como son el bocio endémico y retraso mental. Por otro lado, la fluorización también ha sido establecida mundialmente como una medida preventiva que reduce la aparición de caries dental (<http://www.amisac.org.mx>).

La Norma Oficial Mexicana NOM-040-SSA1-1993, exceptúa agregar flúor a la sal que se destina para consumo en poblaciones donde el agua de consumo humano contenga concentración natural de flúor de 0.7 mg/L. Por otro lado, la yodación sólo se permite descartar siempre y cuando se demuestre que afecta a la calidad del producto. En la **Figura 1** se muestra la distribución de sal yodada y sal yodada-fluorurada en México de acuerdo a la Asociación Mexicana de la industria Salinera A.C. (AMISAC).



Figura 1. Distribución de Sal Yodada y Sal Yodada-Fluorurada en México.
(<http://www.amisac.org.mx>)

El cloruro de sodio se encuentra en forma natural en muchas partes del mundo, como es en el caso de las minas, que se encuentra en depósitos del mineral *halita*. Por otro lado, también se encuentra en agua de mar, la que contiene cerca de 3.5% de concentración de NaCl. En los lagos salados también se encuentran otro tipo de sales, pero principalmente cloruro de sodio. Algunos de estos lagos llegan a poseer una concentración de sal superior a la del agua de mar debido a que son considerados geográficamente como una cuenca endorreica terminal, por lo que el contenido del agua suele evaporarse aumentando su salinidad, razón por la que los lagos salados son considerados lugares idóneos para la producción de sal (Larsen, 1986; Ishikawa, *et al.*, 2003).

El método de obtención de sal más utilizado mundialmente, consiste en obtener agua de mar, que se evapora a través de la acción combinada de energía solar y viento. Cuando la salmuera alcanza su punto de saturación da inicio a la cristalización del cloruro de sodio. La AMISAC reporta que el 90% de la sal producida en México es a través de este método y se denomina sal solar o sal marina, comúnmente conocida por sal de grano. En la **Figura 2** se muestra los productores de la sal solar y sal evaporada al alto vacío en México (Lück, *et al.*, 2000; Oren, 2009; <http://www.amisac.org.mx>).



Figura 2. Productores de sal en México.
(<http://www.amisac.org.mx>)

En este trabajo se analizarán dos muestras mexicanas de sal de grano para consumo humano de diferente procedencia geográfica, bajo un estudio polifásico con el objetivo de establecer diferencias en su composición microbiológica. A continuación se presentará un breve descripción sobre el proceso de obtención de las muestras de estudio.

3.2.1. Sal de grano de Cuyutlán, Colima (SCC)

La muestra de sal de grano **SCC** es originaria de Cuyutlán, Colima y es una de las materias primas con las que se elabora el queso Cotija en México. Esta sal, es extraída de la Laguna de Cuyutlán que consta de 7,200 hectáreas (**Figura 3**), localizada en la costa del Pacífico y se reporta que en promedio anualmente tiene una salinidad de 36% (p/v). Además, es considerada como una de las fuentes más importante de recursos pesqueros y salineros en el estado, por lo que constituye una alternativa de ingresos económicos para un gran número de familias (Cabral, 2010; Estrada, 1999).



Figura 3. Localización geográfica aproximada de la Laguna de Cuyutlán.

A finales del siglo XVIII, Cuyutlán producía anualmente grandes cantidades de sal que eran distribuidas en Guanajuato, Taxco y la Ciudad de México para su comercialización, ya que era una materia prima indispensable para la producción de plata; sin embargo, a finales del siglo XIX, la producción de sal ya no era enfocada para ello, ya que se había comenzado a implementar el beneficio de plata con cianuro, pero para ese entonces, la sal de Colima ya había adquirido un gran prestigio para consumo humano.

En un principio, las salinas fueron propiedad comunal de las poblaciones indígenas y poco a poco por los españoles fueron acaparados estos terrenos salinos, y una vez dueños de las tierras, rentaban los terrenos de cada pozo a los salineros que eran indígenas y mestizos. Fue hasta 1952 que la Sociedad Cooperativa de Salineros de Colima (S.C.L.) adquirió 4,283 hectáreas (http://www.sinectica.iteso.mx/assets/files/articulos/24_salineros_de_cuyutlan.pdf).

Actualmente, la extracción de sal se realiza utilizando una técnica artesanal, ya que era utilizada por nuestros antepasados indígenas, a la cual se han incorporado innovaciones en la producción. El proceso es considerado artesanal particularmente porque se utiliza equipos manuales y además, se distingue porque sólo se utilizan condiciones naturales para su obtención.

En general, el proceso consiste en hacer pequeños bordos manuales, con el mismo material del suelo de la laguna, creando pequeños estanques. Es ahí donde se extrae la sal por desecación solar. Para la recolección de sal, se utilizan instrumentos como palas, cepillos (**Figura 4**) y carretillas para su transportación. Esta producción es considerada de temporal y es denominada temporada de zafra de las salinas, que es de febrero a junio y termina cuando caen las primeras lluvias de temporada (<http://www.mexicocampoadentro.org/sal.php>).



Figura 4. Producción de sal de grano en la Laguna de Cuyutlán, Colima .
(<http://www.youtube.com/watch?v=i-7yvtbJ8KE>)

3.2.2. Sal de grano de Cd. Obregón, Sonora (SMC)

La muestra de sal de grano proveniente de Cd. Obregón, Sonora, es una muestra comercial yodatada procesada por Sales del Valle S.A. de C.V. y registrada como “Sal de Mar de Cortés®” (**SMC**). (**Figura 5**).

Sales de Valle se reporta como una compañía 100% mexicana que procesa la sal producida por evaporación en las salinas operadas por la empresa matriz desde hace 30 años, Salina de Lobos, en Bahía de Lobos, Sonora (Sales del Valle S.A de C.V). (**Figura 6**).



Figura 5. Presentación comercial de sal de grano de Mar de Cortés® SMC.

(<http://www.salesdelvalle.com.mx/toque.html>)



Figura 6. Localización de Salina de Lobos en Bahía de Lobos y Cd. Obregón, Sonora.

(<http://www.salesdelvalle.com.mx/toque.html>)

Se consideran grandes productoras de sal cuando la manufactura es más de 20,000 toneladas por temporada de zafra. En general, el proceso de obtención de sal es efectuado con tecnología moderna utilizando diversas máquinas con el fin de rendir al producto sin impurezas. Esto se realiza con un ciclo totalmente automático con dispositivos que realizan la decantación del agua (piletas de decantación), el lavado de la sal, seguido de una centrifugación, molienda y secado de la sal; por último, se realiza el tamizado (según el tipo de sal), y empaquetamiento (<http://www.manfredinieschianchi.com/206-3ES-instalacion-para-tratamiento-de-sal-marino-y-mineral.htm>).

En la **Figura 7** se muestra la producción automatizado de sal refinada (Sal Bahía®) por Sales del Valle S.A de C.V.



Figura 7. Producción de Sal refinada por Sales del Valle S.A de C.V.

(<http://www.salesdelvalle.com.mx/toque.html>)

3.3. Microorganismos halófilos

En los ecosistemas en donde se encuentra una concentración de sal significativa, se han hallado microorganismos y se ha clasificado de acuerdo a la tolerancia a dichas concentraciones de sal; estos microorganismos son nombrados como microorganismos halófilos (Frazier, *et al.*, 2003; Hui, *et al.*, 2006).

Existe una discrepancia entre autores para clasificar a estos microorganismos con base en su tasa óptima de acuerdo a la crecimiento de concentración de sal. (Echigo, *et al.*, 2005; Hedi, *et al.*, 2009; Larsen, 1986; Lück, *et al.*, 2000; Nieto, *et al.*, 1989; Rohban, *et al.*, 2009; Ventosa, *et al.*, 2008).

Para este trabajo se definirán a estos microorganismos como se presenta en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Clasificación de microorganismos halófilos.

Clasificación	%NaCl (Ventosa, <i>et al.</i> 2008.)	Molar [NaCl] (Nieto, <i>et al.</i> 1989)
No halófilos	0 - 1	0 - 0.2
Halófilos ligeros	1 - 3	0.2 - 0.5
Halófilos moderados	3 - 15	0.5 - 2.5
Halófilos extremos	15 - 25 Incluso a Saturación (36%) (Lück, <i>et al.</i> , 2000)	2.5 - 5.2 Saturado

En general, las bacterias halófilas son microorganismos quimiorganótrofos y utilizan aminoácidos (fuente de nitrógeno) o ácidos orgánicos (fuentes de carbono) como fuente de nutrientes y energía, y requieren principalmente vitaminas como factores de crecimiento. Estos microorganismos han desarrollado diversas estrategias bioquímicas, incluyendo la síntesis intracelular de compuestos orgánicos (llamados biocompatibles), para contrarrestar la tendencia celular a deshidratarse en ambientes con alta presión osmótica manteniendo una a_w apropiada para el desarrollo de sus reacciones bioquímicas y así, mantener la estructura y función celular. (Curtis, *et al.*, 2006; Hedi, *et al.*, 2009; Margesin, *et al.*, 2001; Oren, 2009; Rohban, *et al.*, 2009).

Las bacterias halófilas han sido relativamente poco estudiadas en comparación con la extensa literatura sobre la fisiología, la bioquímica y la ecología de la familia *Halobacteriaceae* perteneciente

al dominio *Archaea*, por lo que es comparado su comportamiento. Además, los solutos orgánicos que contienen las bacterias halófilas, proporcionan el equilibrio osmótico, por lo que sus proteínas extracelulares muestran una composición de aminoácidos similar a los estudiados en las arqueas halófilas, así que el mecanismo de adaptación a las altas concentraciones de sal resulta ser similar (Ventosa, *et al.*, 1998).

El género *Halobacterium* es miembro de la familia *Halobacteriaceae*. En este género se ha estudiado ampliamente el comportamiento y composición celular en presencia de un ambiente hipersalino. En general los microorganismos halófilos, realizan el balance de agua de manera positiva con el medio ambiente. Su pared celular contiene una glicoproteína compuesta por aminoácidos ácidos (cargados negativamente) como el aspartato y glutamato, y es estabilizada por iones sodio que es fundamental para mantener la integridad de la célula; cuando escasea el sodio, se vuelve insuficiente la repulsión electrostática de las cargas negativas y se conduce a una lisis celular. Además, las proteínas citoplasmáticas contienen muy baja proporción de aminoácidos hidrofóbicos como lisina (sobre todo si se comparan con bacterias no halófilas), ya que las proteínas muy polares en un medio muy iónico tienden a permanecer en solución, mientras que las no polares tienden agruparse y perder actividad (Madigan, *et al.*, 2006; Curtis, *et al.*, 2006).

3.3.1. Microorganismos halófilos en ecosistemas marinos

La gran diversidad de microorganismos halófilos que se encuentran en la naturaleza aún están lejos de ser plenamente explorados. Se han estudiado pocos ecosistemas salinos como es el Gran Lago Salado (E.U.), el mar Muerto, el lago haloalcalino Elmenteita (Kenia), entre otros.

Se han logrado identificar algunos géneros como son: *Bacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Marinobacter*, *Enterococcus*, *Marinilactibacillus*, *Halolactibacillus*, *Alcalinocabterium* y *Streptomyces*, entre otros (Echigo, *et al.*, 2005; Fog Moller, *et al.*, 2010; Kobayashi, *et al.*, 2004; Ishikawa, *et al.*, 2003 y 2005; Mwirchia, *et al.*, 2010; Romano, *et al.*, 2010; Ventosa, *et al.*, 2008).

3.3.2. Aplicaciones de microorganismos halófilos

Hasta el momento se han estudiado pocos usos comerciales para estos microorganismos. Las estrategias que estas bacterias han desarrollado para adaptarse a tales condiciones ha sido el verdadero motivo que ha llamado la atención de la industria para aplicaciones biotecnológicas como se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Ejemplos de aplicaciones Industriales de microorganismos halófilos.
(Margesin, *et al.*, 2001; Oren, 2009)

Interes Industrial	Tipo	Microorganismo halófilo	Observaciones
Producción de Ectoína	Metabolito Primario	<i>Ectothiorhodospira halochloris</i> (Halófilo extremo)	Protege enzimas y ácidos nucleicos contra la alta salinidad, desnaturalización térmica, la desecación y la congelación.
		<i>Halomonas elongata</i> (Halotolerante)	Contrarresta los efectos del envejecimiento de la piel inducida y acelerada por la luz UV.
Amilasa	Enzima	<i>Haloarcula</i> sp. (Halófilo extremo)	Funciona de manera óptima con una concentración de 4.3 M de sal a 50°C y es estable en benceno, tolueno y cloroformo.
Isomerasa	Enzima	<i>Halobacterium halobium</i> (Halófilo extremo)	Se activa en un amplio intervalo de temperatura y concentraciones de sal y no requiere de magnesio ni ATP para su actividad.
Biopolímero poli-β-hidroxiacanoato (PHA)	Metabolito Secundario	<i>Haloferax mediterranei</i> (Halófilo moderado)	Polímero que se utiliza para la producción de plásticos biodegradables con propiedades parecidas al polipropileno.
		<i>Halomonas boliviensis</i> (Halófilo moderado)	
Biosurfactantes (Lichenisin, Lipopéptido)	Metabolito Primario	<i>Bacillus licheniformis</i> JF-2 (Halotolerante)	Mejorar la remediación de agua y suelos contaminados de petróleo, mediante la disminución de la tensión superficial y aumentando la solubilidad.
Glicerol	Metabolito Primario	<i>Dunaliella</i> sp. (Halófilo moderado)	Aplicación en diferentes industrias como: Alimentaria y Farmacéutica, etc.
β-caroteno	Metabolito Secundario		Antioxidante y colorante alimentario

Por otra parte, la industria alimentaria ha estudiado alimentos salados fermentados y ha hallado diversos microorganismos halófilos, que sugiere que participan en dicha fermentación. Algunos ejemplos estudiados se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Ejemplo de microorganismos hallados en alimentos salados fermentados.

Alimento Fermentado	Microorganismo	Referencia
Camarón Jeotgal	<i>Halalkalicoccus jeotgali</i>	Oren, 2009.
Salsa de Soya Indonesa	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	Margesin, <i>et al.</i> , 2001.
Salsa de Soya Japonesa	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	Kobayashi, <i>et al.</i> , 2004.
Anchoas Saladas		Gildberg, <i>et al.</i> , 2001.
Salsa de Pesacado Espadín		
Pasata China de Soya Fermentada	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	Cui, <i>et al.</i> , 2012.
	Especies de Enterococos	
Gouchujang, Comida Koreana Fermentada	<i>Bacillus</i> spp.	Jang, <i>et al.</i> , 2011.
	<i>Bacillus licheniformis</i>	
	<i>Bacillus subtilis</i>	
Cangrejo Fermentado en Salsa de Soya	<i>Salinococcus carnicancri</i> sp.	Jung, <i>et al.</i> , 2010.
Quesos Europeos	<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i>	Ishikawa, <i>et al.</i> , 2006.
	<i>Alkalibacterium olivapovliticus</i>	
Queso Cotija	<i>Bacillus</i> spp.	García-Saturnino, <i>et al.</i> , 2010
	<i>Marinilactibacillus</i> sp.	García, 2010.
	<i>Enterococcus asini</i>	
	<i>Enterococcus termitis</i>	Gómez, 2010.
	<i>Vagococcus</i> sp.	Casillas, 2013.

Dado que los autores mencionados en la **Tabla 4** sugieren que la adición sal participa en la maduración de los productos y algunos son de origen marino, es importante tomar en cuenta los siguientes puntos para poder realizar una exploración con métodos microbiológicos tradicionales:

1. En los ambientes marinos existe una distribución de oxígeno en el agua que depende del nivel de profundidad.
2. Se caracterizan por la presencia de sales en una concentración de 3.2-3.8% (p/v).
3. En el agua de mar, existen condiciones alcalinas y se conoce que el pH de la superficie de agua es de 8.2-8.3.

Por lo anterior, los microorganismos que podemos encontrar en este hábitat son: halófilos ligeros y moderados, alcalófilos y, aerobios, anaerobios o aerobios facultativos (Ishikawa, *et al.*, 2003; Larsen, 1986; Margesin, *et al.*, 2001; Ventosa, *et al.*, 2008).

3.3.3. Queso Cotija

En el equipo de trabajo se ha estudiado la microbiota bacteriana del queso Cotija, que es un producto lácteo artesanal que se produce en México en la región de JALMICH. Se clasifica dentro de los quesos maduros, de pasta no cocida, dura, seca, desmenuzable, salada y ácida. La Asociación Regional de productores de Queso Cotija, en el 2005 publicó las “Reglas de uso” cuyos objetivos incluyen apoyar a los productores, en la estandarización del proceso de manufactura e iniciar la protección oficial del producto, ya que que está en vías de obtener su Denominación de Origen (Álvares, *et al.*, 2005).

Se reporta que el Cotija tiene un 5% de NaCl en base seca y que la sal utilizada para su elaboración es marina, comúnmente conocida como sal de grano, obtenida de forma artesanal en el estado de Colima, como se ha descrito en los antecedentes de este trabajo (Álvares, *et al.*, 2005; García, 2006).

Cabe mencionar que el cloruro de sodio en el queso, logra inhibir el crecimiento de la microbiota inicial del producto ya que la sal, al ser higroscópica, deja menos agua disponible (a_w) para el crecimiento de algunos microorganismos; además, que se provoca un incremento de la presión osmótica de la fase acuosa del alimento, causando la deshidratación de células microbianas; además reduce la solubilidad del oxígeno en el agua (Frazier, *et al.*, 2003; Hui, *et al.*, 2006).

La actividad del agua (a_w) está definida como el cociente de la presión de vapor de agua en el alimento sobre la presión del vapor de agua pura a una temperatura dada. Una forma de disminuir el a_w es por la adición de NaCl, con lo que se puede retardar la multiplicación de microorganismos ya que se afectan múltiples procesos de la fisiología microbiana y, por lo tanto, a la cinética del desarrollo microbiano.

El valor de a_w de una solución saturada se encuentra en la región de 0.75 a temperatura ambiente (**Figura 8**). La mayoría de los microorganismos halófilos crecen por arriba de este límite, sin embargo existen algunos microorganismos que son capaces de crecer por debajo de este límite aunque es muy poco común, por esto es imposible la protección total frente a los ataques microbianos usando solamente sal común. Las levaduras osmófilas como *Sacharomyces rouxii* y algunos mohos como *Aspegillus equinulatus* y *Monascus bisporus* son microorganismos que toleran un intervalo de a_w de 0.65-0.60 (Fenema, 2000; Larsen, 1986; Lück, *et al.*, 2000).

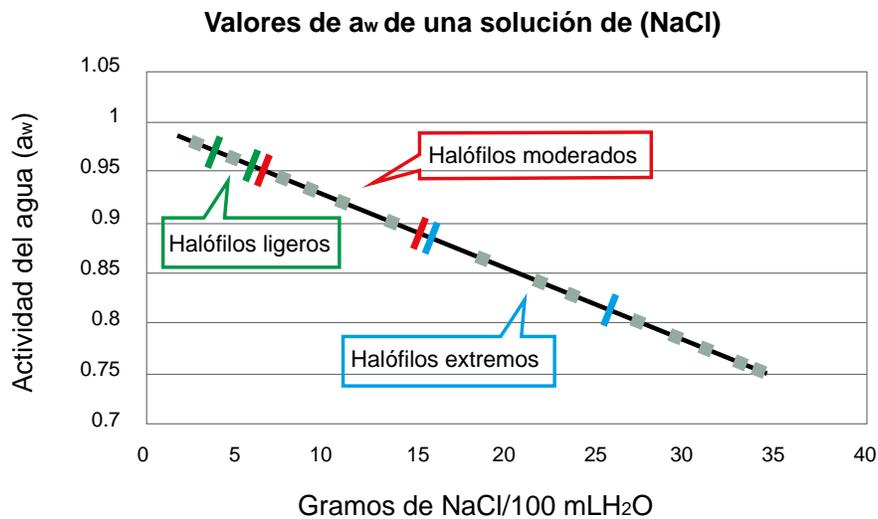


Figura 8. Valores de a_w de una solución de [NaCl]. Se hace una comparación de los valores que representa a_w frente una relación p/v de NaCl y la clasificación de microorganismos halófilos dada para este trabajo en la **Tabla 2**. (Lück, *et al.* 2000; Nieto, *et al.* 1989; Ventosa, *et al.* 2008)

En el Cotija, aún no se conoce totalmente la microbiota presente en él; sin embargo, en su proceso de elaboración se han identificado varios puntos críticos, por su posible fuente de inoculación de microorganismos. García, (2010) sugirió que el salado es la etapa en donde se lleva a cabo una importante inoculación de bacterias que participan en la fermentación del producto. Esta etapa se lleva a cabo incorporando la sal directamente a la cuajada y es mezclada manualmente. En cambio, Gómez, (2010) y Casillas, (2013) utilizando métodos independientes de cultivo (PCR-DGGE), lograron identificar géneros de bacterias halófilas como: *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Vagococcus* y *Enterococcus*.

Dado que se sugiere que en salado es una etapa en el que se lleva una importante inoculación de microorganismos que participan en la fermentación del Cotija y que la sal que se utiliza para su elaboración es de origen del estado de Colima, este trabajo pretende establecer posibles diferencia en la microbiota halófila presente en dos muestras de sal de grano antes ya descritas (**SCC** vs. **SMC**), desarrollando un estudio polifásico esto es a través de la utilización de métodos dependientes de cultivo y métodos moleculares.

3.4. Métodos microbiológicos dependientes de cultivo

La microbiología tradicional no ha sido suficiente para estudiar todo tipo de ecosistemas, ya que más del 90% de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando técnicas tradicionales porque en realidad no se conocen los nutrientes necesarios para ser cultivados (Díaz, *et al.*, (2003); Jany, *et al.*, 2008).

Se han descrito algunas limitaciones del uso de las técnicas microbiológicas tradicionales, como son (Díaz, *et al.*, 2003; Jany, *et al.*, 2008):

1. Se requieren largos periodos de incubación y la elaboración de los medios de cultivo.
2. No se conocen las condiciones para su cultivo y si las condiciones de cultivo son pobres, la diversidad microbiana real será mal interpretada.
3. Pueden existir coincidencias fenotípicas similares con cepas genotípicamente diferentes.
4. Algunos microorganismos no pueden ser aislados porque dependen de las actividades de otros microorganismos para su crecimiento, y algunos otros pueden perder su actividad para reproducirse.

Por otra parte, en los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la diversidad microbiana gracias a uso de métodos independientes de cultivo que se basan en el análisis directo de ácidos nucleicos (ADN o ARN). Estos métodos moleculares no requieren el cultivo de los microorganismos, son rápidos y su estudio es potencialmente más exhaustivo; por lo que algunos autores sugieren que realizar un estudio polifásico, combinando métodos dependientes e independientes de cultivo, se obtiene una visión más detallada y precisa de la estructura de las comunidades microbianas (Ampe, *et al.*, 1999; Jany, *et al.*, 2008; Miambi, *et al.*, 2003; Temmerman, *et al.*, 2004).

3.5. Métodos microbiológicos independientes de cultivo

En general, para explorar la diversidad microbiana con métodos independientes de cultivo, primero se realiza la extracción total de ADN, ésta puede ser directa (extracción del ADN total de la muestra) o indirecta (extracción de microorganismos de la muestra, seguida de la extracción de ADN de estos); segundo, se realiza la amplificación de la región del gen deseada mediante la PCR; y tercero, se realiza el análisis de los productos de amplificación (Díaz, *et al.*, 2003; Jany, *et al.*, 2008; Muyzer, 1999).

3.5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR, tiene por objeto obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular. Este procedimiento se lleva a cabo bioquímicamente mediante el uso de la ADN polimerasa y de iniciadores o cebadores de la amplificación bajo condiciones de reacción controladas (Deng, *et al.*, 2008; Sangines, 1998).

Los componentes de la mezcla que son necesarios para llevar a cabo la reacción son los siguientes:

1. *Templado (ADN molde)*: Contiene la región de ADN que se desea amplificar, que también se denomina ADN blanco.
2. *ADN polimerasa*: Enzima termoestable capaz de sintetizar cadenas de ADN.
3. *Cebadores*: Son oligonucleótidos necesarios para dar inicio a la reacción de síntesis. Son complementarios a las cadenas de ADN molde. Son pequeños fragmentos de ADN de cadena simple (entre 18 y 22 nucleótidos) que flanquean el fragmento de ADN que se quiere amplificar. El tamaño máximo recomendado de amplicon es de aproximadamente 3 kb.
4. *dNTPs (Desoxinucleótidos trifosfato)*: Mezcla de dATP, dTTP, dGTP y dCTP que es utilizada como sustrato para sintetizar nuevas cadenas de ADN.

-
-
5. **Solución amortiguadora:** Mantiene el pH óptimo para el funcionamiento de la enzima.
 6. **Magnesio (Mg^{2+}):** Actúa como cofactor de la polimerasa y generalmente es agregado como cloruro de magnesio o sulfato de magnesio.

El proceso de PCR por lo general consiste en llevar la mezcla de reacción a través de una serie de 20 a 35 ciclos repetidos a diferentes temperaturas. En la **Figura 9** se muestra los ciclos de reacción; cada ciclo suele consistir de tres pasos básicos: desnaturalización, hibridación y extensión (Kirk, *et al.*, 2004; Wintzingerode, *et al.*, 1997).

1. **Inicio:** Algunas enzimas requieren el aumento de temperatura en la mezcla a 94-96°C durante 1 a 9 minutos para su activación.
2. **Desnaturalización:** Separación de las dos hebras de ADN molde mediante calentamiento (90-95°C) durante un minuto. La temperatura utilizada dependerá de la cantidad de G+C y de la longitud del ADN molde.
3. **Hibridación (Alineamiento):** Unión de los cebadores a cada una de las cadenas de ADN molde mediante la disminución de temperatura a 50-65°C durante 20-40 segundos.
4. **Extensión (Elongación):** Síntesis de la cadena complementaria. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTPs que corresponden en dirección 5' → 3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTPs con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente. La temperatura y el tiempo que se aplica dependen de la enzima utilizada, 72°C y 20 a 40 segundos son las condiciones más comúnmente utilizadas.
5. **Extensión final:** Etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74°C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ello se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado.

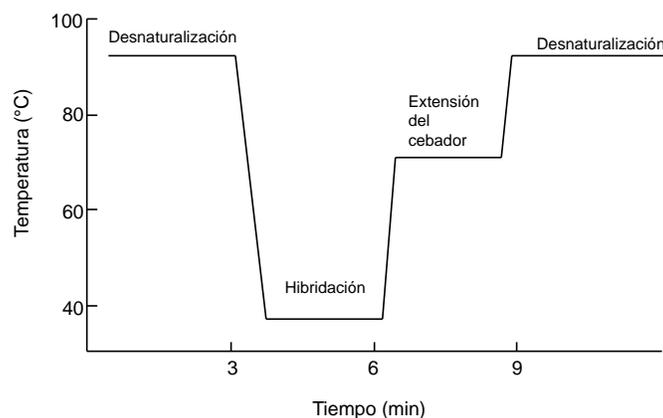


Figura 9. Proceso de las etapas de la PCR (Sangines, F., 1998).

Los limitantes de esta técnica son (Díaz, *et al.*, 2003):

1. Se deben optimizar las condiciones de la reacción de amplificación, así como también las cantidades y concentraciones de los reactivos para poder amplificar el ADN de la mayoría de los microorganismos.
2. Por su alta sensibilidad, puede dar lugar a la obtención de falsos positivos debido a contaminaciones por errores técnicos, como son el mal manejo de material o reactivos, y malas condiciones ambientales.

Para la identificación de los microorganismos, se deben utilizar ciertas moléculas que funcionan como cronómetros moleculares o evolutivos (también conocidos como marcadores), ya que éstos aportan información taxonómica por diferencias en la secuencia (Díaz, *et al.*, 2003; Jany, *et al.*, 2008).

En el caso de los procariotes, los ARN ribosómicos (ARNr) son funcionalmente constantes, están universalmente distribuidos y su secuencia está moderadamente bien conservada a través de amplias distancias filogenéticas. El más utilizado es el ARNr 16S, el cual es un polinucleótido de aproximadamente 1,500 pares de bases, codificado por el gen ADN ribosomal 16S (ADN 16S) y está compuesto por nueve regiones (V1-V9) y a partir de la comparación de secuencias parciales o del gen completo, se puede obtener información filogenética y taxonómica (Madigan, *et al.*, 2006; Jany, *et al.*, 2008; Muyzer, 1999; Temmerman, *et al.*, 2004).

Como se mencionó anteriormente, después de la amplificación de ADN se realiza un análisis del producto obtenido de la PCR, generalmente con la obtención de “huellas digitales” (conocida en inglés como *molecular fingerprinting*), que se han convertido el de mayor interés para el estudio de comunidades microbianas, ya que puede determinar la dinámica de la comunidad en respuesta de las variaciones ambientales y de tiempo, sin ser necesariamente cultivadas. El método más utilizado con este fin es la electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE); en general, se fundamenta en la separación de fragmentos obtenidos de la PCR con la misma longitud, pero con diferente secuencia, basados en su perfil diferencial de desnaturación (Ercolini, 2004; Díaz, *et al.*, 2003; Muyzer, 1999).

3.5.2. Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

La técnica consiste en utilizar un gel de acrilamida, el cual contiene un ambiente desnaturalizante, el cual proporciona unas cantidades crecientes de urea y formamida, donde una solución 100% desnaturalizante se compone de 7 M de urea y 40% formamida en una solución amortiguadora. La cadena doble del ADN se convierte en una cadena parcialmente sencilla, cuando se somete a este entorno desnaturalizante, disminuyendo su velocidad de migración en el gel de acuerdo a su perfil diferencial de desnaturalización (T_m); ésta depende de la variación en la secuencia de los fragmentos de ADN correspondiente a cada microorganismo. Para evitar la separación completa de las dos cadenas, se agrega una secuencia rica en GC con 30-50 pb (denominada grapa GC) en el extremo 5' de uno de los cebadores. La electroforesis se lleva a cabo a una temperatura y voltaje constante (Ercolini, 2004; Muyzer, *et al.*, 1997; Muyzer, 1999; Temmerman, *et al.*, 2004).

Para conocer el óptimo o mejor intervalo de concentración desnaturalizante, son utilizados los geles perpendiculares (el gradiente es perpendicular a la dirección de la electroforesis). En este tipo de geles se forma una curva sigmoidea, donde se observa que las cadenas dobles migran a bajas condiciones desnaturalizantes y de manera contraria como migran las cadenas sencillas. Las condiciones ideales son las intermedias, en las que las moléculas de ADN se funden parcialmente (Díaz, *et al.*, 2003; Jany, *et al.*, 2008; Muyzer, *et al.*, 1997).

El tiempo óptimo en el que se debe llevar a cabo la electroforesis, se determina en electroforesis con gradientes paralelos (**Figura 10**), ya que permite la máxima resolución entre los fragmentos de DNA (Díaz, *et al.*, 2003; Muyzer, *et al.*, 1997).

Una limitación del DGGE que se ha descrito frecuentemente es la obtención de múltiple bandeo a partir de la amplificación de ADN de un microorganismo. Esto es que se obtiene varios amplicones que migran diferente pero que al ser secuenciados y comparados con las bases de datos ribosomales, llevan a la misma identidad. Este efecto representa una complicación en el análisis de patrones de bandeo de DGGE de muestras de comunidades microbianas, donde hipotéticamente, una banda correspondería a un microorganismo.

Con base a lo anteriormente expuesto, se podría obtener un mayor número de bandas, que no corresponderían necesariamente al mismo número de microorganismos. A este fenómeno se denomina microheterogeneidad y es explicado por la presencia de múltiples copias del gen ARN ribosomal 16S y que las copias de este gen han evolucionado de manera diferente por la necesidad del mismo microorganismo para adaptarse en ambientes no favorables (García-Saturnino, *et al.*, 2010; Muyzer, *et al.*, 1997).

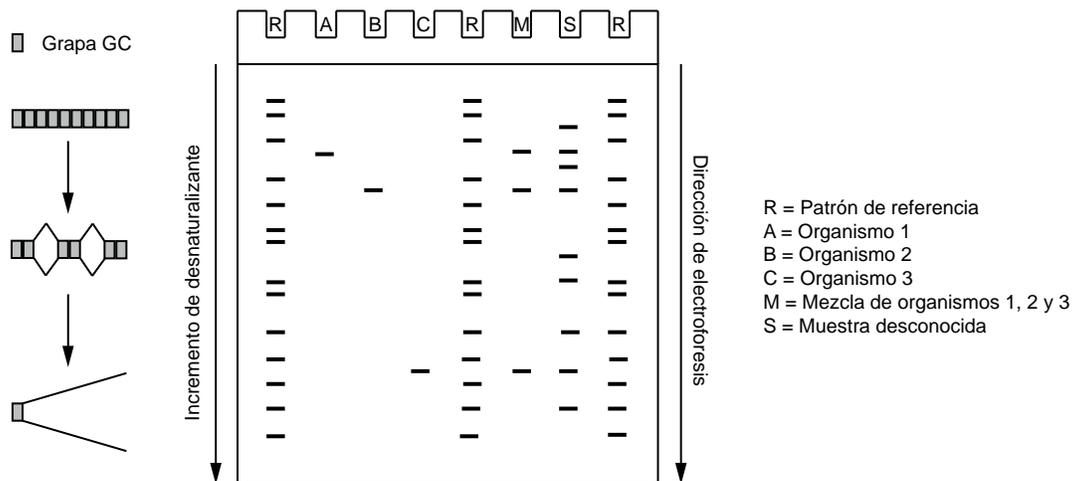


Figura 10. Principio de DGGE, los productos de PCR que comparten la misma longitud son separados por electroforesis de forma dependiente a su secuencia, con base en el contenido de G+C. El incremento del gradiente desnaturante a lo largo del gel le confiere al ADN pasar de doble cadena a cadena sencilla por medio de dominios de fusión lo cual disminuirá su movilidad (y por tanto su posición en el gel). Una grapa de GC unida al extremo 5' de uno de los cebadores previene a los productos de una total desnaturación. Diferentes secuencias darán origen a distintos dominios de fusión y en consecuencia diferentes posiciones en el gel donde el ADN se detiene. (Temmerman, *et al.*, 2004)

IV. JUSTIFICACIÓN

En diferentes estudios de la microbiota bacteriana presente en el queso Cotija realizados dentro del equipo de trabajo, se han identificado bacterias halófilas. Se ha establecido que dentro de la elaboración de este producto mexicano, en la etapa del salado existe una importante inoculación de bacterias que participan en su fermentación. En general, se han identificado a los géneros *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Vagococcus* y *Enterococcus* utilizando métodos independientes de cultivo (PCR-DGGE) y se han observado huellas génicas muy similares de las bacterias halófilas provenientes del Cotija comparadas con las de una muestra de sal de Colima, misma con la que se ha elaborado este producto.

Cabe mencionar que el Cotija se encuentra en vías de obtener la Denominación de Origen, por lo que, con el objetivo de estandarizar y proteger al producto, fueron publicadas las “Reglas de uso”, mismas que describen la etapa de salado y el tipo de sal que debe ser de utilizada.

Bajo las circunstancias descritas, surgió el interés de conocer la microbiota bacteriana halófila presente en una muestra de sal de grano originaria del estado de Colima (materia prima del Cotija), con la utilización de métodos de cultivo selectivos con el fin de aislar bacterias halófilas para su posterior identificación a través de la técnica de PCR-DGGE y secuenciación de la región V3 del ADN 16S. Con fines comparativos, se utiliza la misma estrategia, para el análisis de una sal proveniente de Cd. Obregón, Sonora. Este estudio polifásico tiene el propósito de establecer posibles diferencias en la composición microbiana en las muestras de sal mediante el cultivo de bacterias halófilas y una posterior secuenciación parcial del gen ribosomal 16S.

V. HIPÓTESIS

Si dos muestras de sal de grano tienen diferente procedencia geográfica, entonces existirán diferencias en la composición halófila bacteriana presente en cada una de ellas.

VI. OBJETIVOS

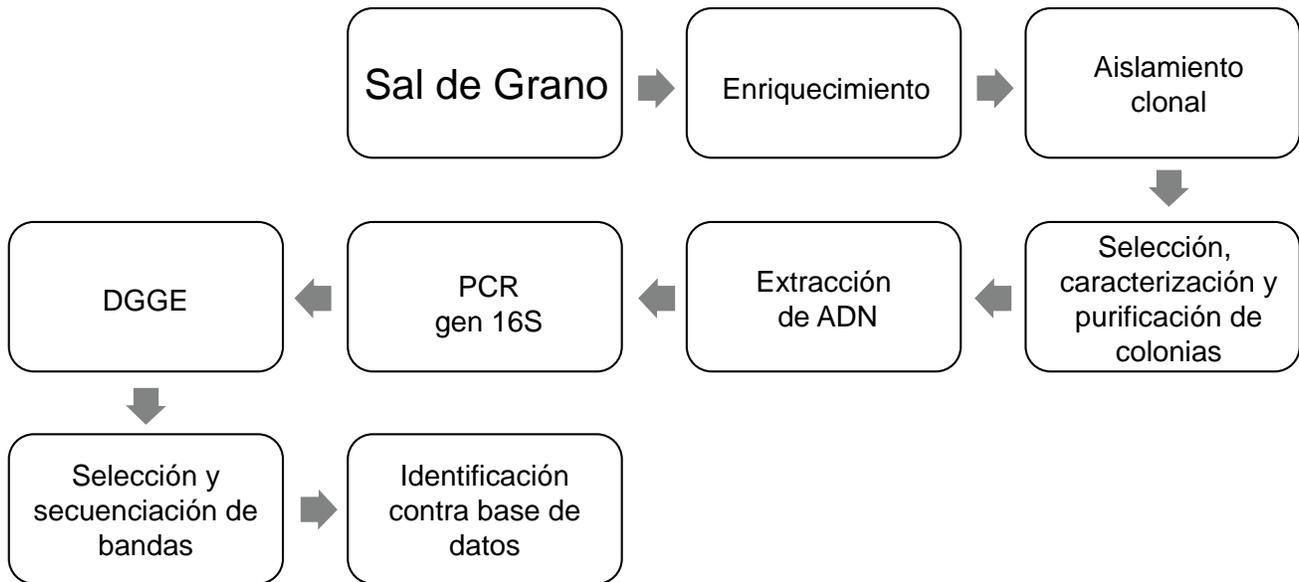
OBJETIVO GENERAL

Establecer si existen diferencias en la microbiota bacteriana halófila en dos muestras de sal de grano, por medio de un estudio polifásico que comprende en la utilización de medios de cultivo selectivos y la posterior identificación de cepas aisladas a través de métodos moleculares.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar bacterias halófilas de dos muestras de sal de grano de origen mexicano, utilizando medios de cultivo selectivos reportados para microorganismos provenientes de ecosistemas marinos.
2. Seleccionar al azar colonias de acuerdo a sus diferentes características coloniales y microscópicas para la posterior amplificación de la región V3 del 16S del ARN ribosomal, utilizando los cebadores universales.
3. Separar los amplicones con la técnica de DGGE para la secuenciación e identificación de bandas características.
4. Comparar la diversidad bacteriana identificada de cada una de las muestras de sal de grano.

VII. METODOLOGÍA REPRESENTADA EN DIAGRAMA DE FLUJO



VIII. METODOLOGÍA

8.1. Muestras de sal de grano

Se analizaron 2 muestras de sal de grano (**Tabla 5**), las cuales se mantuvieron almacenadas a temperatura ambiente durante su estudio.

Tabla 5. Muestras de estudio.

Muestra		Observaciones
SCC	Sal de Cuyutlán Colima	Sal tipo artesanal
SMC	Sal de Mar de Cortés (Sales del Valle S.A. de C.V., Cd. Obregón, Sonora)	Sal tipo comercial

8.2. Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo y las condiciones de incubación, se eligieron de acuerdo a lo reportado en la bibliografía de los microorganismos de interés (García, 2010; Gómez, 2010; Ishikawa, *et al.*, 2006; Mwirchia, *et al.*, 2010). En la **Tabla 6** se muestran su composición.

Tabla 6. Composición de medios de cultivo base.

	GYP	XYP	GYPF	GYPB
	mg/100 mLH ₂ O			
Glucosa ¹	100	-	1000	1000
Extracto de Levadura (Bioxon)	500	500	500	500
Peptona de Carne (Bioxon)	500	500	205	205
K ₂ HPO ₄	100	100	100	100
MgSO ₄	20	20	20	-
Xilosa ¹	-	100	-	-
Peptona de Caseína (Bioxon)	-	-	295	295
Extracto de Pescado ³	-	-	500	-
MnSO ₄ ²	-	-	1	-
FeSO ₄ ²	-	-	1	-
Tioglicolato de Sodio ²	-	-	100	100
Extracto de Carne (Bioxon)	-	-	-	500
Acetato de Sodio	-	-	-	1000
Tween 80	-	-	-	500
CaCO ₃	-	-	-	150
Azida de Sodio	-	-	-	1
Cicloheximida ²	-	-	-	1
Colistina ²	-	-	-	1

pH final 8.5

¹ Componentes del medio que fueron esterilizados individualmente por autoclave.

² Componentes del medio que fueron esterilizados individualmente por filtración con membrana de 0.2 µm, Millipore®.

^{1 y 2} Estos componentes fueron agregados al medio de cultivo ya estéril y frío.

³ Componente del medio donado por Dr. Fernando García Carreño, CIBNOR. Fue esterilizado por autoclave en conjunto de la mayoría de los componentes.

8.3. Análisis microbiológicos con métodos tradicionales

8.3.1. Enriquecimiento de microorganismos presentes en la sal

Se colocaron 7 g de las muestras de Sal de gano (**Tabla 5**) por cada 100 mL de medio de cultivo base ya estéril (**Tabla 6**) en un matraz de 125 mL. Se incubaron a 30°C sin agitación hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) a 600 nm cercana a 0.7.

Con el fin de caracterizar el crecimiento microbiano de las muestra de estudio, se desarrollaron curvas de crecimiento (**Figura 11**) midiendo la densidad óptica cada 24 horas para cada medio de cultivo.

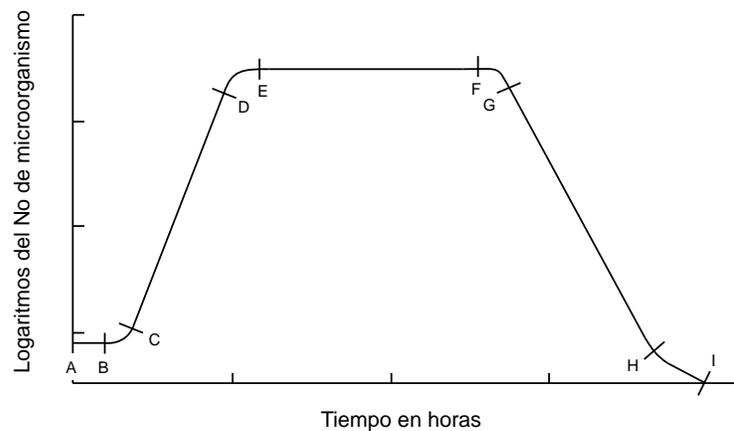


Figura 11. Curva de crecimiento microbiano de un microorganismo. De A a B, fase de latencia; de B a C, fase de aceleración positiva; de la C a D, fase logarítmica o exponencial; de la D a E, fase de aceleración negativa; de E a F, fase estacionaria máxima; de la F a G, fase de muerte acelerada; G a H, fase de muerte; y de H a I, fase de supervivencia (Frazier, *et al.*, 2003).

8.3.2. Cultivo de microorganismos en medio sólido

Para la preparación de medio de cultivo sólido se adicionó NaCl (grado reactivo) al 7% (p/v) al medio de cultivo base; se utilizó agar bacteriológico al 1.5% (p/v) como agente solidificante, se ajustó a pH 8.5 con NaOH y fueron esterilizados por autoclave.

Se inocularon en el medio sólido, descrito anteriormente, 100 µL de una dilución de enriquecimiento de cada una de las muestras de sal y se incubaron a 30°C por 48 horas. Este análisis se realizó por triplicado.

La inoculación en placa se realizó siguiendo la metodología de Mwirchia (2010) e Ishikawa (2006):

1. Para los medios de cultivo GYP y XYP se inoculó por extensión en superficie.
2. Para los medios de cultivo GYPF y GYPB se inoculó por vertido en placa y se adicionó un recubrimiento. En la **Tabla 7** se muestra su composición de la sobre capa para cada medio.
3. Se realizaron las diluciones necesarias con Solución Salina estéril al 3.5% para obtener de 30-300 UFC.

Tabla 7. Componentes del recubrimiento para medios GYPF y GYPB.

Reactivo	GYPF	GYPB
	<i>mg/mLH₂O</i>	
Agar	1.5%	1.5%
MnSO ₄ *	0.02	-
FeSO ₄ *	0.02	-
Tioglicolato de sodio *	1	1
Acetato de Sodio	-	10
CaCO ₃	-	1.5

* Componentes del medio que fueron esterilizados individualmente por filtración con una membrana de 0.2 µm, Millipore®.

8.3.3. Caracterización, aislamiento y purificación de colonias

Se seleccionaron al azar 7 colonias por medio de cultivo considerando que tuvieran diferentes características coloniales. Se realizaron 2 resiembras por agotamiento en el mismo medio de donde se aislaron y se visualizaron en microscopio para determinar su pureza (tinción de Gram).

Las colonias se conservaron por congelación con el método descrito en el **Anexo I**.

8.3.4. Recuperación de paquete celular

1. En un tubo de centrifuga de 50 mL con un volumen determinado (**Tabla 8**) de medio de cultivo base con 7% (p/v) de NaCl (grado reactivo), se inoculó cada colonia por asada y se incubó a 30°C sin agitación, hasta alcanzar una D.O. cercana a 7.

Siguiendo esta metodología, los asilados de los medios GYPF y GYPB no se desarrollaron, por lo que se tuvieron que realizar pruebas con diferentes volúmenes de medio de cultivo (7,10 y 13 mL) en un tubo de centrifuga de 15 mL. Se observó que al aumentar el “espacio de cabeza” (espacio entre el medio de cultivo y la tapa) puede intervenir el oxígeno existente dentro de este espacio, lo que ocasionó que estas colonias tuvieran un mejor desarrollo.

Tabla 8. Volumen de medio de cultivo determinado para su óptimo crecimiento de acuerdo a sus necesidades de oxígeno.

<i>Volumento total de tubo de centrifuga (mL)</i>	<i>Medio de cultivo (mL)</i>			
	GYP	XYP	GYPF	GYPB
50	10	10	25	25

2. Se centrifugó a 9.782x g (Biofuge Primo R, Heraeus) durante 10 minutos a 4°C.
3. Se desechó el sobre nadante y se lavó el pellet 2 veces con 10 mL de solución salina estéril al 0.85% a pH 7, y se centrifugó a 9.782x g durante 10 minutos entre cada lavado.
4. Se re-suspendió el pellet con 2 mL Solución Salina estéril al 0.85% NaCl a pH 7, lavando las paredes, y se transfirió en 2 pasos a un vial de 2 mL centrifugando a 19,064.1x g durante 10 min a 4°C entre cada paso, eliminando el sobrenadante.
5. Los paquetes celulares se almacenaron a -20°C hasta su uso.

8.4. Análisis microbiológico con métodos moleculares

8.4.1. Extracción de ADN

La extracción y purificación de ADN de los cultivos puros se realizó de acuerdo al protocolo de un sistema comercial (Fast ID®). La extracción se logra por la ruptura celular por detergentes iónicos y se utiliza una membrana de sílica para unión y purificación de ADN.

1. Las células fueron mezcladas con 1 mL de Solución de Lisis (Solución de Lisis + Proteinasa K) y Lisozima (~5 mg) e incubadas a 37°C a 35x g durante 30 minutos (Thermomixer, Eppendorf).
2. Se centrifugó a 19,064.1x g por 10 minutos (Biofuge Primo R, Heraeus).
3. Se tomaron 800 µL de sobrenadante y se transfirieron a un vial de 2 mL y se añadió cloroformo en relación 1:1.
4. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 9,726.6x g por 5 minutos.
5. Se separó la fase acuosa y se transfirió a un vial de 2 mL y se agregó buffer de unión en relación 1:1.
6. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 9,726.6x g por 5 minutos.
7. Se transfirió el sobrenadante a la columna con una membrana de sílica y se centrifugó a 9,726.6x g por 5 minutos.
8. Se lavó la columna con 700 µL de buffer de lavado y dos veces con 700 µL de etanol al 75%. Entre cada lavado se centrifugó la columna a 19,064.1x g por un minuto.
9. El exceso de alcohol fue eliminado por centrifuga con las mismas condiciones.
10. El ADN de la columna se eluyó con buffer TE 1X incubado por 10 minutos a 65°C y recuperado un vial de 1.5 mL por centrifugación a 19,064.1x g durante un minuto.
11. El ADN fue almacenado a -20°C hasta su uso.

8.4.2. Análisis de ADN extraído

Se midió la absorbancia a 260 y 280 nm ($A_{260}/A_{280} > 1.8$) para cuantificar y verificar la pureza del ADN extraído en un espectrofotómetro (Epoch™, Biotek). Se utilizó el software Gen 51.10 para el análisis de datos.

8.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó la PCR para la amplificación de la región V3 del gen que codifica a la subunidad 16S del ARN ribosomal, utilizando los cebadores universales (Agc 338F y B518R), bajo las condiciones dadas por Zuñiga (2009). Estos cebadores se describen en la **Tabla 9** y las concentraciones y volúmenes requeridos se presentan en la **Tabla 10**.

Tabla 9. Cebadores utilizados.

Cebador	Secuencia 5´- 3´	Posición (respecto al genoma de E. coli)	Orientación
*Agc 338F	C GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGG GGG ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	357-338	Directa
B518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG	534-518	Reversa

* Grapa

Tabla 10. Componentes y concentraciones de la mezcla de reacción.

Componente	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen (µL)
Amortiguador Buffer-MgSO ₄	10x	1x	5
dNTPs	1 mM	0.2 mM	1
Cebador 338F o Agc338F	10 µM	0.4 µL	1
Cebador 518R	10 µM	0.4 µL	2
Templado	X ng/reacción	200 ng/reacción	x
Pfu polimerasa	5 U/µL	2.5 U/reacción	0.5
Agua grado Biología Molecular	-	-	cbp 50 µL

*Los reactivos se mantuvieron en baño de hielo hasta su uso.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Maxygene, Axygene o Techine TC 312, Thermo scientific) bajo las condiciones que se presentan en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Condiciones de la PCR.

Numero de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (m)	Etapas
1	94	5	Desnaturalización inicial
20	94	1	Desnaturalización
	65	1	Alineación
	72	3	Extensión
10	94	1	Desnaturalización
	55	1	Alineación
	72	3	Extensión
1	72	10	Extensión final

8.4.4. Análisis de amplicones

Los amplicones se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (p/v) teñidos con bromuro de etidio (1 µL/10 mL agarosa) (Invitrogen). Con el fin de verificar la presencia y peso de ADN se utilizó como marcador MassRuler™ Low Range o DNA ladder y Orange™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas). La electroforesis se llevó a cabo a 85 V por 45 minutos y los geles se visualizaron en el transiluminador de UV (Mighty Bright UVTM, Hoefer).

8.4.5. DGGE (Electroforesis en gel con un gradiente desnaturizante)

Los amplicones se analizaron por DGGE con un gradiente desnaturizante de 30-70% en gel de poliacrilamida al 8%. La electroforesis se llevó a cabo a 80 V durante 15 horas a 60°C, en buffer TAE 1X, empleando el equipo Dcode™ Universal Mutation (Biorad). La concentración de ADN agregado fue ajustado para todas las muestras a 3 µgADN/µL muestra.

Para la visualización de los amplicones se realizó una tinción de plata. La preparación de las soluciones para DGGE y procedimiento de la tinción de plata se describen en los **Anexos II y III** respectivamente.

8.4.5.1. Selección de bandas de geles de DGGE

De los patrones de bandeo obtenidos de cada colonia aislada de las muestras de trabajo, la selección de bandas se realizó tomando en cuenta los siguientes puntos:

1. Se seleccionaron bandas que se encontraron concentradas y definidas.
2. Se cortó una banda por cada perfil obtenido.
3. En los perfiles con migraciones similar, y cuando fue posible, se eligieron bandas que se encontraran a diferente altura.

8.4.5.2. Extracción de ADN de las bandas de geles de DGGE

Para la extracción de ADN de los geles de DGGE se utilizó el método por difusión en agua (Miambi, *et al.*, 2003). Es importante que este procedimiento se realice después del revelado de las bandas.

1. Se cortaron individualmente las bandas de interés con un bisturí estéril y se depositaron en un vial estéril de 2 mL.
2. Se agregó 50 μ L de agua desionizada, filtrada y estéril ajustada a pH 8.
3. Se incubaron a 37°C con agitación de 35x g (Thermomixer, Eppendorf) por una hora.
4. Se almacenaron las bandas por 48 horas a 4°C.
5. Se separó la fase acuosa por centrifuga a 19,064.1x g por 10 minutos.
6. Se concentró el ADN con una concentración aproximada de 10 ng/ μ L con el método de "Precipitación por Disolventes" descrito en el **Anexo IV**.

8.4.5.3. Reamplificación de ADN extraído de geles de DGGE

Se reamplificó el ADN utilizando los cebadores 338F (sin grapa) y 518R con las mismas condiciones de la región V3 descritas en las **Tabla 10** y **11**.

Los amplicones se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (p/v) teñidos con bromuro de etidio (1 μ L/10 mL agarosa) (Invitrogen) y con el fin de verificar la presencia y peso de ADN se utilizó como marcador MassRuler™ Low Range (Fermentas). La electroforesis se llevó a cabo a 85 V por 45 minutos y los geles se visualizaron en el transiluminador de UV (Mighty Bright UVTM, Hoefer). Los productos deseados fueron de 200 pb y se purificaron con un Sistema de Purificación de ADN (Sistema Roche™) descrito en el **Anexo V**.

8.4.6. Secuenciación

Las muestras fueron secuenciadas en ambas direcciones por MACROGEN-Korea™.

8.4.7. Análisis de secuencias

La comparación de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa BLAST para nucleótidos (Basic Local Alignment Search Tool) con ayuda del banco de datos NCBI (National Center of Biotechnology Information). Los alineamientos de las secuencias directa y reversa se generaron con apoyo del programa MulAlin 2000 (Multiple sequence alignment by Florence Corpet). (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>).

8.4.8. Árbol filogenético

Se verificó la identidad de las secuencias a través de la relación filogenética existente entre los microorganismos identificados y otras secuencias similares de la base de datos GenBank, la cual fue realizada mediante el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). La distancia de la relación fue calculada a través de 10,000 remuestreos con el programa Mega 5.2.2 (Tamura., Peterson, Peterson, Stecher, Nei y Kumar, 2011).

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Análisis de condiciones de cultivo y componentes de medios de cultivo

En este trabajo se utilizaron cuatro medios de cultivo con diferente composición para el aislamiento de microorganismos halófilos. Estos medios de cultivo se seleccionaron a través de la consulta de diferentes fuentes bibliográficas para poder aislar microorganismos provenientes de un ecosistema marino, en especial nos enfocamos en autores que habían reportado el aislamiento de microorganismos de interés para el grupo de trabajo (**Tabla 12**), como es el caso de los géneros *Enterococcus*, *Bacillus* y *Marinilactibacillus*.

Tabla 12. Referencia bibliográfica de medios de cultivo.

Nombre	Componentes primarios	Micróorganismo de interés	Referencia
GYP	Glucosa, Extracto de levadura y Peptona de Carne	<i>Enterococcus</i> y <i>Bacillus</i>	Mwirchia, <i>et al.</i> , 2010.
XYP	Xilosa, Extracto de levadura y Peptona de Carne	<i>Bacillus</i> y <i>Marinilactibacillus</i>	Mwirchia, <i>et al.</i> , 2010.
GYPF	Glucosa, Extracto de levadura, Peptona de Carne, Peptona de Caseína y Extracto de Pescado	<i>Enterococcus</i> y <i>Marinilactibacillus</i>	Ishikawa, <i>et al.</i> , 2003, 2005 y 2006.
GYPB	Glucosa, Extracto de levadura, Peptona de Carne, Peptona de Caseína y Extracto de Carne	<i>Marinilactibacillus</i>	Ishikawa, <i>et al.</i> , 2006; Shu-Juan, <i>et al.</i> , 2008

9.1.1. Componentes de medio de cultivo

Es importante realizar un análisis de las condiciones y componentes de los medios de cultivo porque si estas condiciones no son las adecuadas, la diversidad microbiana no se reflejará en la recuperación de una mayor proporción de la microbiota obtenida.

La fuente de nitrógeno en los medios de cultivo está constituida por preparados proteínicos y digeridos enzimáticos de éstos. En general, la composición de fuente de nitrógeno es mucho más compleja y es agregada en mayor proporción en comparación de la fuente de carbono, ya que estos microorganismos tienen este requerimiento, dado por la necesidad de la síntesis intracelular de compuestos orgánicos para soportar una presión osmótica elevada ocasionada por el NaCl (Mwirchia, *et al.* 2010; Ishikawa, *et al.*, 2003, 2005 y 2006).



a)



b)



c)



d)

Figura 12. Representación de medios de cultivo sin ser inoculados.
a) GYP; b) XYP; c) GYPF; y d) GYPB.

Cabe mencionar que los medios de cultivo **GYPF** y **GYPB** se caracterizan por contener una fuente de nitrógeno mucho más compleja y, además, contienen otros factores inhibitorios que hacen a estos medios mucho más selectivos que los medios **GYP** y **XYP**. Estos factores de inhibición se caracterizan por lo siguiente:

1. **Tioglicolato de sodio:** Favorece el crecimiento de microorganismos de anaerobios.
2. **Azida de sodio y Colistina:** Inhiben el crecimiento de bacterias Gram-negativas.
3. **Cicloheximida:** Inhiben el crecimiento de microorganismos eucarióticos.

9.1.2. Condiciones de cultivo

Las condiciones de incubación se determinaron tomando en cuenta el ambiente de donde provienen los microorganismos que se deseaban cultivar así como lo reportado en la literatura, estas condiciones se describen en la **Tabla 13** (Álvarez, *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2003; Larsen, 1986; Margesin, *et al.*, 2001; Ventosa, *et al.*, 2008).

Tabla 13. Justificación de medios de cultivo.

Condición		Clasificación	Motivo de selección
<i>pH</i>	8.5	<i>Alcalófilos</i>	El pH de la superficie de agua de mar es de 8.2-8.3.
<i>% NaCl</i>	7	<i>Halófilo moderado</i>	Concentración utilizada por García, 2010 y Gómez, 2010
<i>Temperatura</i>	30 °C	<i>Mesófilos</i>	Microorganismos de mayor abundancia.
<i>Oxígeno</i>	-	<i>Aerobios y aerobios facultativos</i>	La distribución de oxígeno en el agua depende del nivel de profundidad.

9.2. Análisis microbiológico con métodos tradicionales

La primera etapa del análisis microbiológico consistió en utilizar métodos tradicionales; como se revisó en el punto anterior.

9.2.1. Enriquecimiento de microorganismos presentes en la sal

Primeramente fue necesario enriquecer las dos muestras de sal en los cuatro medios de cultivo ya descritos. Esta etapa es fundamental para la recuperación de células viables y así poder cultivarlas en medio sólido, caracterizarlas e identificarlas.

A continuación analizaremos las curvas de crecimiento que se obtuvieron siguiendo la metodología descrita en el punto **8.3.1.** de este trabajo (**Figuras 13**).

Se realizó una caracterización de acuerdo a su crecimiento en los medios líquidos, que se describen en la **Tabla 14**. Cabe mencionar que esta caracterización se realizó bajo las definiciones del manual de prácticas de microbiología general de la Facultad de Química, UNAM (2008) **Anexo VI**.

Análisis de la muestra SCC y SMC en medios de enriquecimiento

El crecimiento los microorganismos provenientes de la muestra **SCC** tienen el siguiente comportamiento (**Tabla 14 y Figura 13**):

1. De acuerdo a las curva de crecimiento de los medios GYP y XYP, existe una mayor recuperación de microorganismos; además, se observó alta turbidez y sedimento en comparación de los otros medios de cultivo.
2. En medios GYP, XYP y GYPF, a partir de las 24 horas, la velocidad con la que se multiplican los microorganismos comienza a disminuir y aproximadamente a las 48 horas, se observa que los microorganismos entran en la fase estacionaria.
3. En la curva de crecimiento del medio GYPB existe una fase de adaptación que comprende 48 horas. Este medio reporta la menor D.O., y el crecimiento fue pobre en comparación con los demás medios de cultivo.

El crecimiento de los microorganismos provenientes de la muestra **SMC** se comportan de la siguiente manera (**Tabla 14 y Figura 13**):

1. En los medios GYP y XYP se observa una mayor recuperación de microorganismos. En el medio GYP se reportó mayor D.O. se observó crecimiento superficial y abundante sedimento en comparación de los otros medios.
2. En el medio GYPF a partir de las 24 horas la velocidad de multiplicación comenzó a disminuir y a las 48 horas se observa que los microorganismos se encuentran en la fase estacionaria. Además, se observaron características de cultivo pobres en comparación con los otros medios de cultivo.
3. En la curva de crecimiento del medio GYPB existe una fase de adaptación que comprende 48 horas. Este medio reporta la menor D.O., además, el crecimiento fue mucho más escasó.

Tabla 14. Características fenotípicas de las muestras de sal en medio de enriquecimiento.

	SCC	SMC	SCC	SMC	SCC	SMC	SCC	SMC
	GYP		XYP		GYPF		GYPB	
Crecimiento superficial	Nulo	Floculento	Nulo	Floculento	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo
Turbidez	Alta	Mediana	Alta	Mediana	Alta	Mediana	Ligera	Ligera
Sedimento (cantidad y tipo)	abundante y viscoso	abundante y compacto	abundante y compacto	abundante y viscoso	abundante y viscoso	Escaso y compacto	abundante y compacto	Escaso y compacto

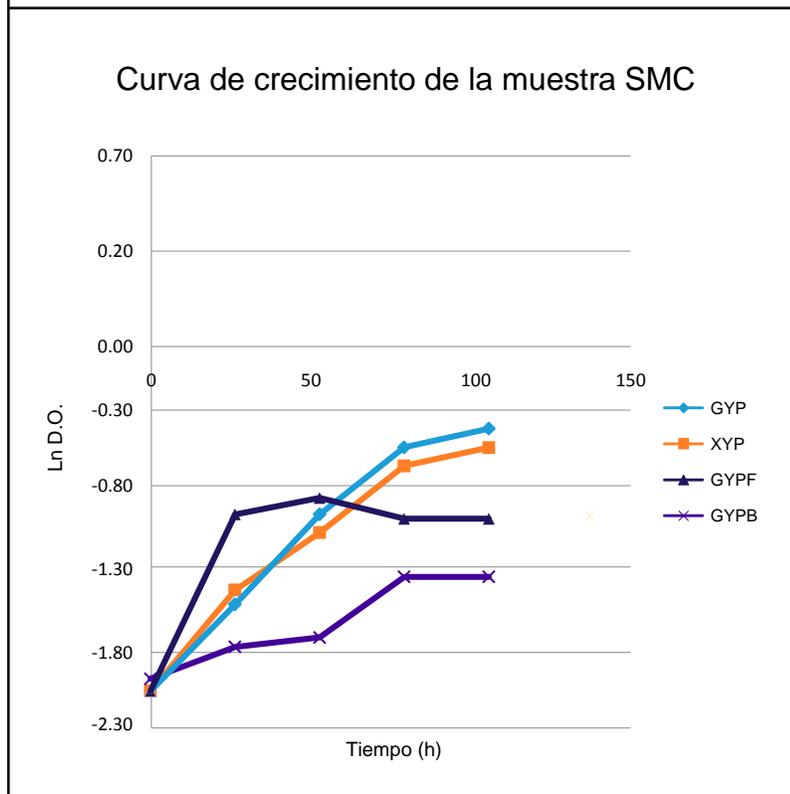
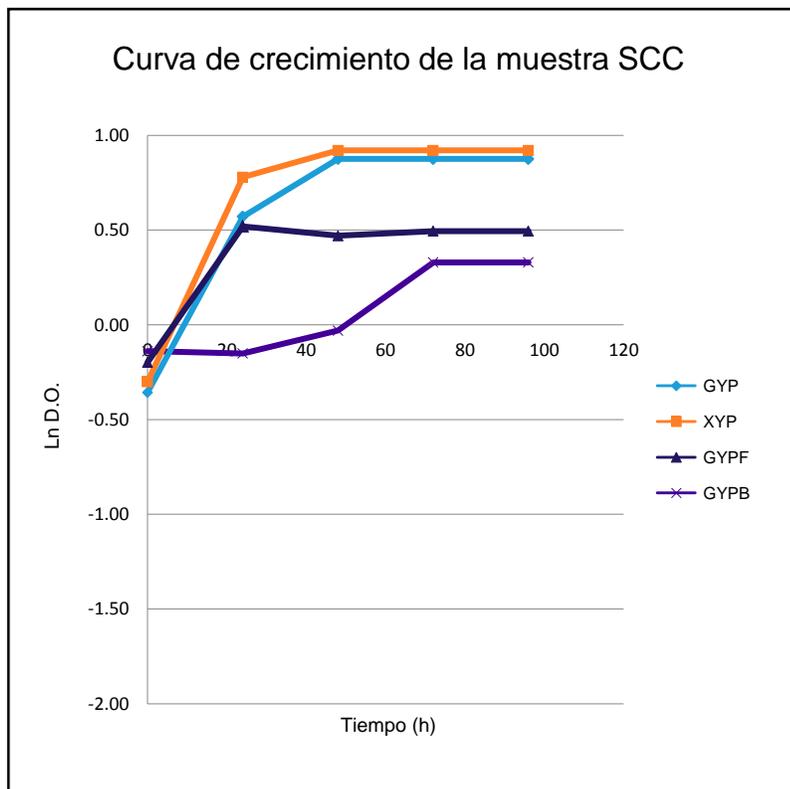


Figura 13. Curvas de crecimiento de las muestra **SCC** y **SMC** en diferentes medios de cultivo, incubadas a 30°C sin agitación.

Por los análisis anteriores podemos hacer un comparativo en la recuperación microbiana de las dos muestras de sal en los medios de enriquecimiento.

1. En los medios GYP y XYP pudiera existir una mayor adaptación celular para los microorganismos de las dos muestras de sal.
2. El medio GYPB es el medio más selectivo, por lo que se observó menor desarrollo microbiano para las dos muestras de sal.
3. El crecimiento de los microorganismos presentes en la muestra **SMC** fue menor que la muestra **SCC** en todos los medios.

9.2.2. Análisis de cultivo de microorganismos en medio sólido

Para realizar el recuento de las células viables, posteriormente del enriquecimiento celular, se prosiguió con el cultivo de microorganismos en medios sólidos incubados a 30°C, después de que cada medio de enriquecimiento alcanzó una D.O. a 600 nm de 0.7, obteniendo el siguiente reporte de UFC por cada gramo de muestra de sal inoculada (**Tabla 15**).

Tabla 15. Cuantificación en placa.

Medio de cultivo	Muestra			
	SCC		SMC	
	UFC/g	Tiempo de incubación de medio de enriquecimiento (h)	UFC/g	Tiempo de incubación de medio de enriquecimiento (h)
GYP	227x10 ⁴	24	140x10 ²	72
XYP	114x10 ³	24	140x10 ²	72
GYPF	857	24	57	48
GYPB	31	72	0	96

Por lo anterior se consideró lo siguiente:

1. Las dos muestras reportaron un mayor número de UFC en los medios GYP y XYP.
2. Se obtuvo mayor cantidad de UFC en la muestra **SCC** que en **SMC**.
3. GYPB mostró ser el medio más selectivo. En la muestra **SCC** reportó el menor número de UFC y en la muestra **SMC** no hubo crecimiento.

En la muestra **SMC** en el medio GYPB se observó un leve aumento de D.O. a lo largo del tiempo; sin embargo no hubo desarrollo de colonias en placas, lo que pudiera indicar que posiblemente desiste el desarrollo en este medio hasta las 72 horas.

9.2.3. Caracterización, aislamiento y purificación de colonias

Después del cultivo en medio sólido, se prosiguió con la selección de colonias. Esta selección se realizó tomando en cuenta que se deseaba obtener un panorama global de la diversidad microbiana en cada muestra. Se seleccionaron al azar 7 colonias por medio de cultivo, buscando diferencias coloniales considerando lo siguiente: 1. **Color**, 2. **Forma**, 3. **Elevación** y 4. **Bordes**

En total se lograron aislar y caracterizar 49 colonias, y se identificó a cada colonia de acuerdo a lo que se reporta en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Reporte de colonias aisladas de las muestras de sal.

Medio de cultivo	SCC		SMC	
	Número de colonias aisladas	Identificación	Número de colonias aisladas	Identificación
GYP	7	1-7	7	A-G
XYP	7	8-14	7	H-N
GYPF	7	15-21	7	O-U
GYPB	7	22-28	0	-

A pesar de que algunos autores coinciden en que en la microbiología tradicional, el cultivo de microorganismos así como preparación de medios de cultivo, son métodos en donde se invierte largo periodos para la obtención de resultados, también la mayoría de los autores concuerdan que se requieren estos aislados para comprender la fisiología y naturaleza de las muestras de estudio (Ampe, *et al.*, 1999; Díaz, *et al.*, 2003; Jany, *et al.*, 2008; Muyzer, 1999).

En este trabajo, después del aislamiento y purificación se realizó una caracterización fenotípica de cada colonia obtenida de las muestras **SCC** y **SMC**, cultivándolas en medio líquido y sólido, así como observar sus características microscópicas de acuerdo al **Anexo VI**.

9.2.3.1. Caracterización de colonias en medio líquido

Para el estudio colonial en medio líquido fue necesario realizar una curva de crecimiento individual de cada colonia seleccionada, siguiendo la metodología descrita en el punto 8.3.4. de este trabajo. Los resultados se resumen a continuación:

1. Para los medios GYP y XYP ninguno de los volúmenes utilizados afectó en el crecimiento de ninguna de las colonias.
2. Para los medios GYPF y GYPB los volúmenes de 10 y 13 mL no se observó aumento D.O. de las colonias obtenidas de las dos muestras de sal a lo largo del tiempo, debido a que el oxígeno en el medio fue limitado por el “espacio de cabeza”. Este fenómeno se ejemplifica en la **Figura 14**.

Por lo anterior, el análisis correspondiente se realizó con los siguientes volúmenes:

1. GYP y XYP: Con 10 mL de medio en un tubo de cetrifuga de 15 mL.
2. GYPF y GYPB: Con 7 mL de medio en un tubo de cetrifuga de 15 mL.

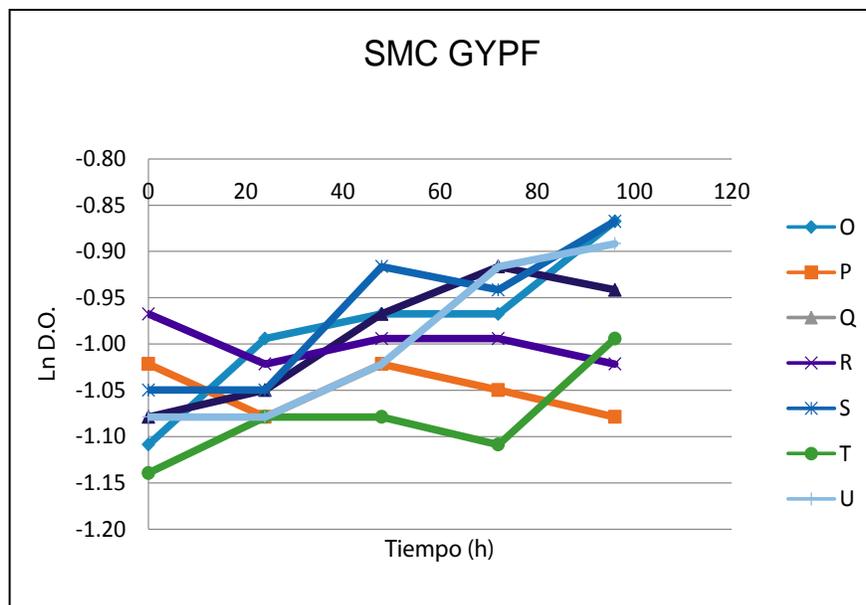


Figura 14.

Ejemplo de una curva de crecimiento de los experimentos de volumen de 10 mL de las colonias puras obtenidas de la muestra **SMC** (colonias O-U) en medio GYPF incubadas a 30°C sin agitación.

Análisis de las colonias aisladas de la muestra SCC en todos los medios

Medio GYP

En casi todas las colonias se observó que a las 24 horas entra en la fase estacionaria, con un comportamiento muy similar entre sí; sólo la colonia 6 presentó fase de adaptación con una duración de 24 horas.

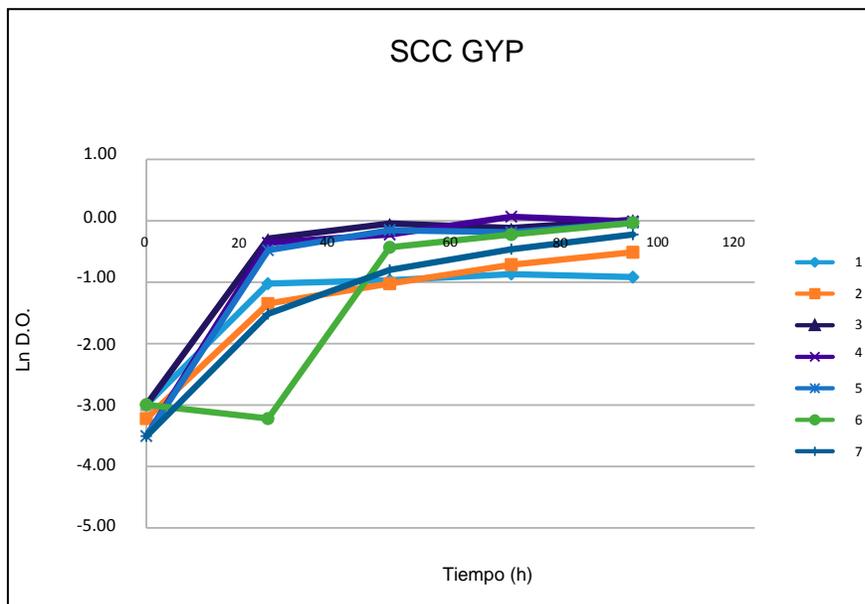


Figura 15.

Curvas de crecimiento de las colonias puras obtenidas de la muestra **SCC** (colonias 1-7) en medio GYP a incubadas a 30°C sin agitación.

Medio XYP

En general, todas las colonias se comportaron de manera semejante; se observó un aumento de D.O. durante 48 horas, excepto la colonia 10 que dejó de crecer a las 24 horas. Sólo en la colonia 9 se observó una fase de adaptación de 24 horas de duración.

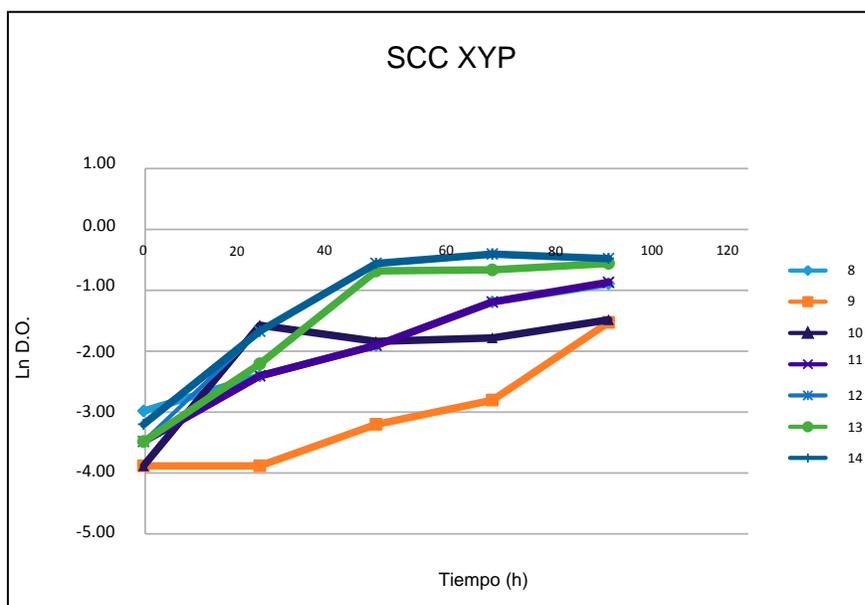


Figura 16.

Curvas de crecimiento de las colonias puras obtenidas de la muestra **SCC** (colonias 8-14) en medio XYP a incubadas a 30°C sin agitación.

Medio GYPF

En este medio de cultivo se puede observar que en ninguna de las colonias alcanzan la fase estacionaria a las 96 horas de cultivo. Se observa un claro aumento de D.O. a lo largo de todo el tiempo de incubación.

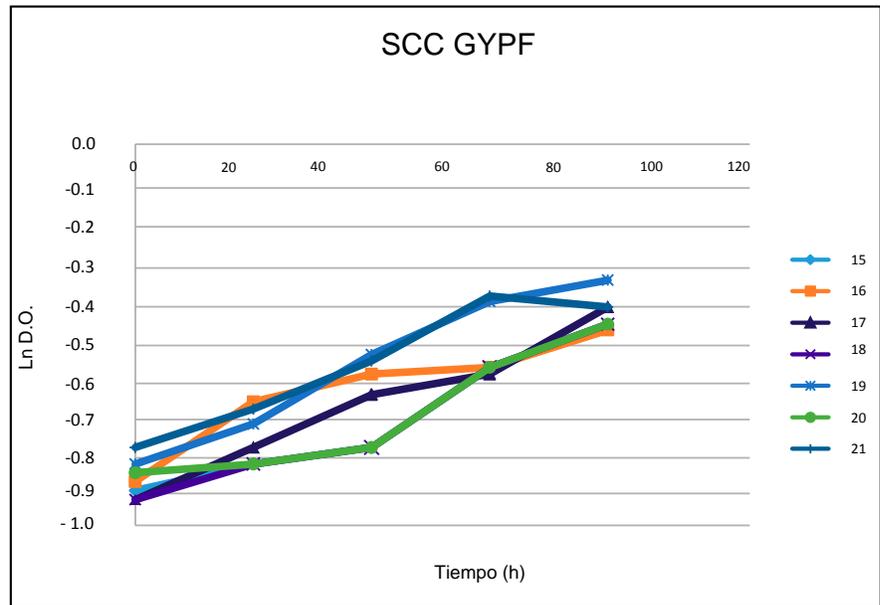


Figura 17.

Curva de crecimiento de las colonias puras obtenidas de la muestra **SCC** (colonias 15-21) en medio GYPF incubadas a 30°C sin agitación.

Medio GYPB

Todas las colonias presentaron un comportamiento de crecimiento similar, exceptuando la colonia 26 con la presencia de una fase de adaptación de 24 horas de duración.

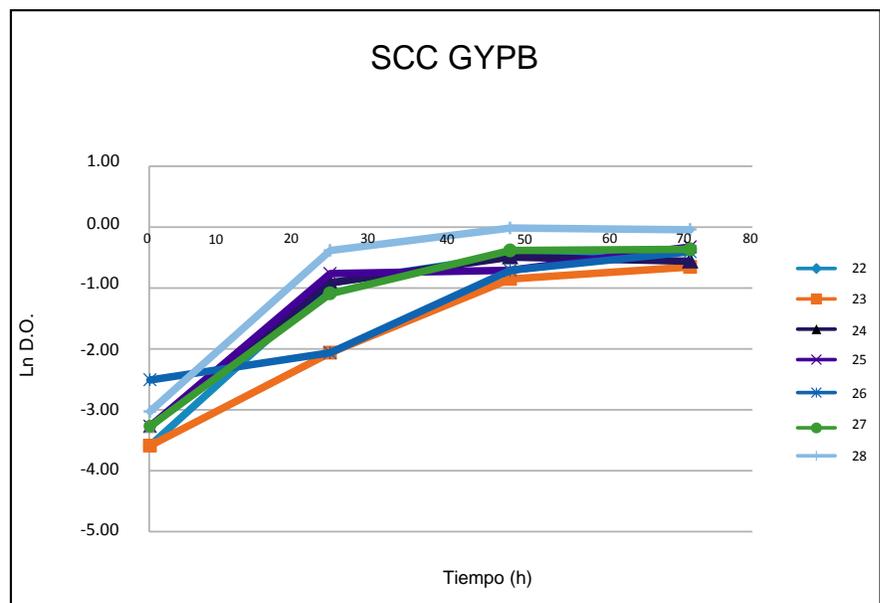


Figura 18.

Curva de crecimiento de las colonias puras obtenidas de la muestra **SCC** (colonias 22-28) en medio GYPB incubadas a 30°C sin agitación.

Análisis de las colonias aisladas de la muestra SMC en todos los medios

Medio GYP

En este medio de cultivo las colonias aisladas de la muestra **SMC** presentaron el mismo comportamiento de crecimiento. A las 24 horas todas comienzan la fase de estacionaria de crecimiento.

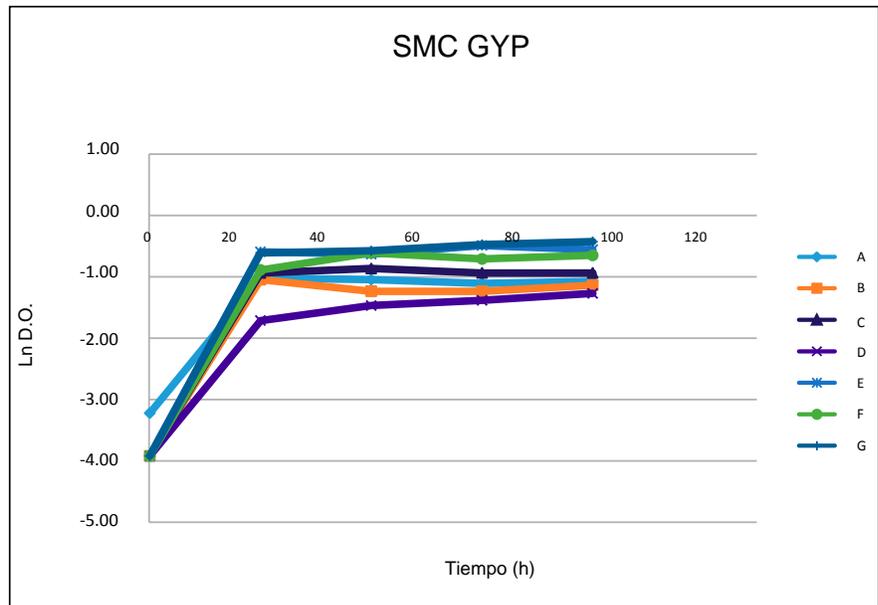


Figura 19.

Curvas de crecimiento de las colonias puras obtenidas de la muestra **SMC** (colonias A-G) en medio GYP a incubadas a 30°C sin agitación.

Medio XYP

El crecimiento en estas colonias fueron similares entre sí; sólo la colonia K alcanzó la fase estacionaria 24 horas después de las demás, esto se explica debido a que presenta una menor D.O. inicial.

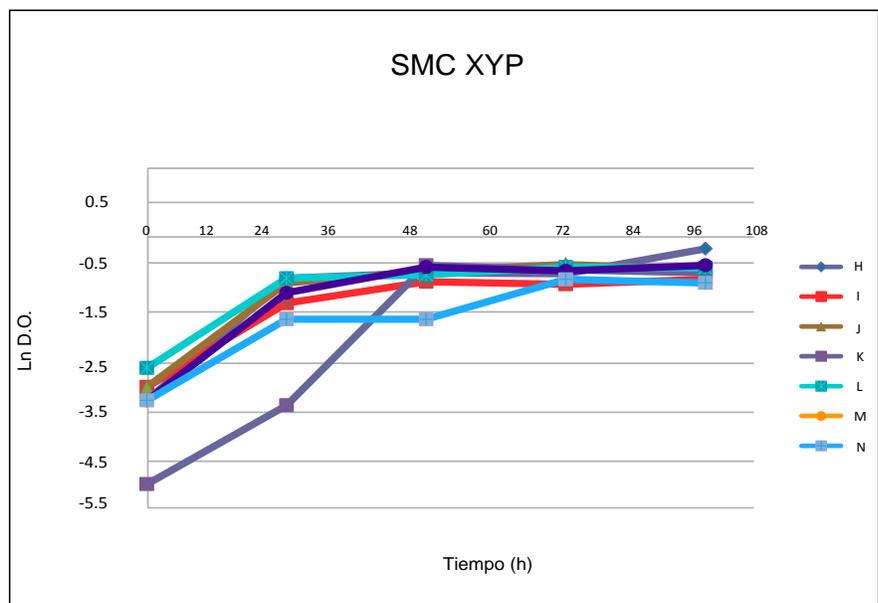


Figura 20.

Curvas de crecimiento de las colonias puras obtenidas de la muestra **SMC** (colonias H-N) en medio XYP incubadas a 30°C sin agitación.

Medio GYPF

Se observa en general que los microorganismos están en fase exponencial durante todo el tiempo de incubación. En particular, las colonias S y U presentan una fase de adaptación de 24 horas de duración, mientras que la T se observó como la colonia con menor aumento de D.O. durante el estudio.

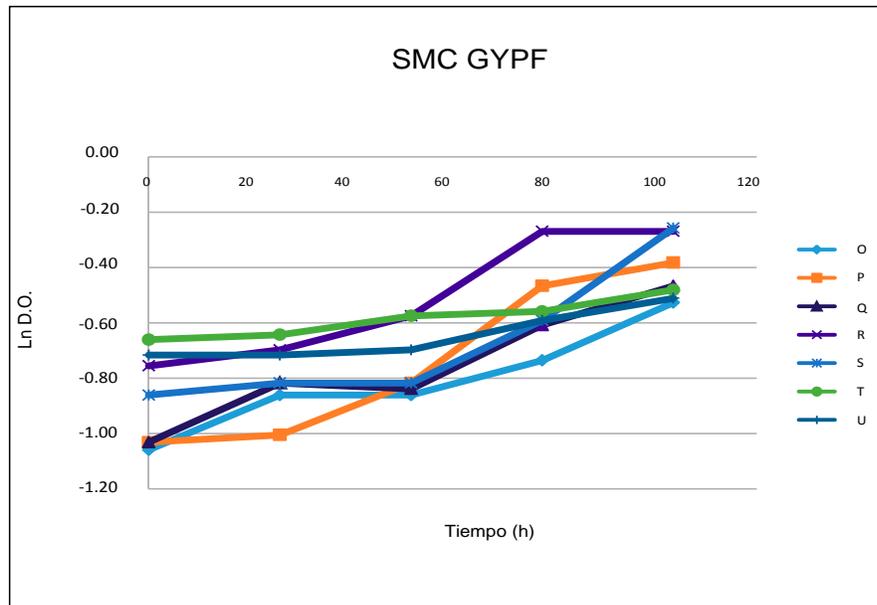


Figura 21.

Curva de crecimiento de las colonias puras obtenidas de la muestra **SMC** (colonias O-U) en medio GYPF incubadas a 30°C sin agitación.

9.2.3.2. Caracterización de colonias en medio sólido, líquido y microscópica

El buscar diferencias fenotípicas entre los aislados, se realizó con el objeto de identificar a diferentes microorganismos de las muestras de sal. En general, se puede decir que no se encontraron muchas diferencias entre colonias. A continuación se describirán las diferentes características fenotípicas de cada colonia obtenidas de las muestras **SCC** y **SMC** cultivadas en medios líquidos, sólidos y las características microscópicas (**Tablas 17-23**).

La caracterización se realizó bajo las definiciones del manual de prácticas de microbiología general de la Facultad de Química, UNAM (2008) que se describen en el **Anexo VI**.

Caracterización de colonias aisladas de la muestra SCC

Tabla 17. Características de colonias obtenidas de la muestra **SCC** en medio GYP.

SCC GYP							
Colonia	1	2	3	4	5	6	7
1. Medio liquido							
Crecimiento Superficial	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo
Opacidad	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Sedimento	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo
2. Colonias en placas							
Forma	Circular	Puntiforme	Puntiforme	Circular	Circular	Circular	Circular
Elevación	Plana	Plana	Plana	Convexa	Plana	Convexa	Convexa
Bordes	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros	Ondulados
Color	Naranja	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
3. Características microscópicas							
Forma	Bacilos cortos	Bacilos	Bacilos cortos	Bacilos Redondos	Bacilos cortos	Bacilos cortos	Bacilos Redondos
Agrupación	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena
Gram	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos

Tabla 18. Características de colonias obtenidas de la muestra **SCC** en medio XYP.

SCC XYP							
Colonia	8	9	10	11	12	13	14
1. Medio liquido							
Crecimiento Superficial	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo
Opacidad	Alta	Alta	Alta	Alta	Ligera	Alta	Ligera
Sedimento	Nulo	Nulo	Escaso y viscoso	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo
2. Colonias en placas							
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Elevación	Plana	Convexa	Plana	Convexa	Plana	Plana	Plana
Bordes	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros
Color	Blanco	Blanco	Naranja	Blanco	Marfil	Blanco	Blanco
3. Características microscópicas							
Forma	Bacilos cortos	Bacilos Redondos	Bacilos Redondos	Bacilos Redondos	Bacilos Cortos	Bacilos Redondos	Bacilos cortos
Agrupación	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena
Gram	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos

Tabla 19. Características de colonias obtenidas de la muestra **SCC** en medio GYPF.

SCC GYPF							
Colonia	15	16	17	18	19	20	21
1. Medio líquido							
Crecimiento Superficial	Nulo						
Opacidad	Ligera						
Sedimento	Escaso y viscoso						
2. Colonias en placas							
2.1 Crecimiento colonial superior al recubrimiento							
Forma	Puntiforme	Rizoide	Circular	Puntiforme	Rizoide	Puntiforme	Circular
Elevación	Plana	Convexa	Plana	Plana	Convexa	Plana	Convexa
Bordes	Ondulados	Ondulados	Enteros	Enteros	Ondulados	Enteros	Enteros
Color	Rosada	Rosada	Amarillo	Rosada	Rosada	Rosada	Rosada
2.2 Crecimiento colonial inferior al recubrimiento							
Forma	Puntiforme	Rizoide	Puntiforme	Puntiforme	Rizoide	Puntiforme	Circular
Elevación	Plana						
Bordes	Enteros	Ondulados	Enteros	Enteros	Ondulados	Enteros	Ondulados
Color	Blanco	Blanco	Amarillo	Blanco	Blanco	Blanco	Marfil
3. Características microscópicas							
Forma	Bacilos Cortos						
Agrupación	Cadena						
Gram	Positivos						

Tabla 20. Características de colonias obtenidas de la muestra **SCC** en medio GYPB.

SCC GYPB							
Colonia	22	23	24	25	26	27	28
1. Medio líquido							
Crecimiento Superficial	Nulo						
Opacidad	Ligera						
Sedimento	Abundante y compacto						
2. Colonias en placas							
2.1 Crecimiento colonial superior al recubrimiento							
Forma	Circular						
Elevación	Plana						
Bordes	Ondulados						
Color	Blanco						
2.2 Crecimiento colonial inferior al recubrimiento							
Forma	Puntiforme						
Elevación	Plana						
Bordes	Enteros						
Color	Blanco						
3. Características microscópicas							
Forma	Bacilos Cortos						
Agrupación	Cadena						
Gram	Positivos						

Caracterización de colonias aisladas de la muestra SMC

Tabla 21. Características de colonias obtenidas de la muestra **SMC** en medio GYP.

SMC GYP							
Colonia	A	B	C	D	E	F	G
1. Medio líquido							
Crecimiento Superficial	Nulo	Muy ligero	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo
Opacidad	Ligera	Alta	Ligera	Ligera	Ligera	Alta	Alta
Sedimento	Escaso y viscoso	Nulo	Escaso y viscoso				
2. Colonias en placas							
Forma	Circular	Putiforme	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Elevación	Convexa	Plana	Convexa	Convexa	Convexa	Plana	Plana
Bordes	Ondulados	Enteros	Ondulados	Ondulados	Enteros	Enteros	Enteros
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
3. Características microscópicas							
Forma	Bacilos Redondos	Bacilos Cortos	Bacilos Cortos	Bacilos Cortos	Bacilos Cortos	Bacilos Redondos	Bacilos Redondos
Agrupación	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena
Gram	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos

Tabla 22. Características de colonias obtenidas de la muestra **SMC** en medio XYP.

SMC XYP							
Colonia	H	I	J	K	L	M	N
1. Medio líquido							
Crecimiento Superficial	Nulo	Nulo	Nulo	Anillado	Nulo	Nulo	Nulo
Opacidad	Alta	Ligera	Alta	Ligera	Alta	Alta	Ligera
Sedimento	Nulo	Abundante y viscoso	Nulo	Abundante y viscoso	Nulo	Nulo	Nulo
2. Colonias en placas							
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Elevación	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Plana	Convexa
Bordes	Ondulados	Enteros	Ondulados	Enteros	Ondulados	Enteros	Elevados
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
3. Características microscópicas							
Forma	Bacilos Redondos	Bacilos Cortos	Bacilos Cortos	Bacilos Cortos	Bacilos Cortos	Bacilos Redondos	Bacilos Redondos
Agrupación	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena
Gram	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos

Tabla 23. Características de colonias obtenidas de la muestra **SMC** en medio GYPF.

SCC GYPF							
Colonia	O	P	Q	R	S	T	U
1. Medio líquido							
Crecimiento Superficial	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo
Opacidad	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Sedimento	Escaso y viscoso	Escaso y viscoso	Escaso y viscoso	Nulo	Nulo	Escaso y viscoso	Nulo
2. Colonias en placas							
2.1 Crecimiento colonial superior al recubrimiento							
Forma	Amiboide	Amiboide	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Elevación	Convexa	Plana	Convexa	Convexa	Plana	Convexa	Plana
Bordes	Ondulados	Enteros	Ondulados	Enteros	Enteros	Ondulados	Enteros
Color	Rosada	Rosada	Rosada	Blanco	Rosada	Rosada	Rosada
2.2 Crecimiento colonial inferior al recubrimiento							
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Elevación	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana
Bordes	Enteros	Ondulados	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros
Color	Marfil	Blanco opaco	Marfil	Blanco	Blanco opaco	Marfil	Blanco opaco
3. Características microscópicas							
Forma	Bacilos Cortos	Bacilos Redondos	Bacilos Redondos	Bacilos Redondos	Bacilos Cortos	Bacilos Cortos	Bacilos Cortos
Agrupación	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena	Cadena
Gram	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos	Positivos

9.2.4. Análisis integral de la utilización de métodos microbiológicos tradicionales

En la etapa de enriquecimiento microbiano de la muestra **SCC** en los medio GYP y XYP, a las 24 horas los microorganismos de esta muestra ya se localizaban en la fase de estacionaria para los dos casos. Sin embargo, se analiza en las **Figuras 15 y 16** que al ser cultivadas individualmente las colonias obtenidas de esta muestra, algunas de ellas requirieron de una fase de adaptación, lo que podría indicar un posible efecto de dependencia de la actividad entre los diversos microorganismos de esta comunidad.

Por otro lado, en la etapa de enriquecimiento de los microorganismos de la muestra **SMC** en los medios de cultivo GYP y XYP se observó crecimiento continuo durante 48 horas, mientras que las colonias aisladas (**Figuras 19 y 20**) se adaptaron con mayor facilidad y su crecimiento máximo se reportó en menor tiempo (24 horas). Esto podría deberse a que los microorganismos pertenecientes a esta muestra compiten por los nutrientes del respectivo medio de enriquecimiento y por lo tanto crecieron con menor tiempo cuando están en conjunto.

Debemos señalar que en general, los microorganismos de estas dos muestras de sal en medios GYP y XYP, su crecimiento no se vio afectado por el volumen de llenado del medio de cultivo; además se reportó que casi todas las colonias cultivadas individualmente, se distribuían a lo largo del tubo ocasionando opacidad en el tubo. Sin embargo, en el enriquecimiento de la muestra **SMC** en medio GYP y XYP se reportó crecimiento superficial y podemos decir que este fenómeno fue ocasionado por las colonias B y K respectivamente, ya que estas bacterias se distribuyeron en la superficie cuando fueron individualmente cultivadas. Por lo que podríamos decir que la microbiota que se desarrolla en los medios GYP y XYP de las dos muestras, pudiera tratarse de microorganismos aerobios y aerobios facultativos; además, de acuerdo a las **Tablas 17, 18, 21 y 22** todos resultaron ser bacilos Gram-positivos con agrupamiento en cadena.

En cambio, en los medios GYPF y GYPB, primeramente se observó que los factores de inhibición que fueron agregados como el tioglicolato de sodio (para los dos medios), la azida de sodio, colistina y cicloheximida (sólo para GYPB), sí afectaron el desarrollo de microorganismos tanto en medio de enriquecimiento como en el cultivo individual de colonias, ya que se reportó de menor abundancia y más tardío para las dos muestras (**Figuras 17, 18 y 21**) en comparación de los medios GYP y XYP. Estos factores hacen más selectivo a los medios por lo que posiblemente pudiéramos identificar microorganismos similares; además, observamos que los patrones de crecimiento obtenidos y características coloniales fueron muy semejantes entre sí.

En el medio de cultivo GYPF, para las dos muestras de sal, no se observó una uniformidad en las curvas de crecimiento realizadas individualmente por colonia. Cabe recordar que en el enriquecimiento de las muestras en este medio, las dos muestras de sal mostraron una fase exponencial corta y con bajo aumento de D.O., y en el cultivo individual, todas las colonias mostraron una fase de adaptación larga o una fase exponencial larga pero sin tanto aumento en su D.O. Todos los microorganismos de las dos muestras de acuerdo a las **Tablas 19 y 23** se reportaron como bacilos Gram-positivos con agrupación en cadena.

El medio GYPB, como se había dicho anteriormente, es el medio más selectivo y en la muestra **SMC** no se logró desarrollo microbiano. Para la muestra **SCC** en este medio de cultivo, se reportaron las mismas características en la **Tabla 20** y el mismo comportamiento en el aumento de la D.O. (**Figura 18**). Todos resultaron ser bacilos Gram-positivos en agrupación en cadena.

Es importante mencionar que cuando se realizó el enriquecimiento de la muestra **SCC** en medio GYPB, se observó que existía una fase de adaptación de 48 h, pero en el cultivo individual de las colonias, se observó que casi todas alcanzan su fase exponencial en 24 h, esto también pudiera deberse a que existe una competencia entre los microorganismos por obtener los nutrientes que requieren y que son otorgados por el medio de cultivo.

Por otro lado, se observó que para los medios GYPF y GYPB, otro factor que afecta al crecimiento de estos microorganismos fue el oxígeno existente en el “espacio de cabeza”. El tioglicolato de sodio y el volumen de llenado del medio, son factores que pueden intervenir en el oxígeno en el medio de cultivo. Por lo que podemos decir que los microorganismos que pudiéramos encontrar en dichos medios de cultivo son aerobios facultativos o microaerobios; además de que para las dos muestras de sal, tanto en el enriquecimiento y en el crecimiento individual de las colonias aisladas, se observó que se distribuían ligeramente a lo largo del medio líquido y reportaron sedimento, excepto en la muestras **SMC** en medio GYPF, estos microorganismos solo reportaron opacidad (**Figura 22**). Además, se observó crecimiento al inferior y superior del recubrimiento en medio sólido.



Figura 22.

Comparación de la distribución de microorganismos de las muestras **SMC** y **SCC** en medios GYPF.

El matraz 1 es medio de enriquecimiento de la muestra **SMC**.

El matraz 2 es el control.

El matraz 3 es medio de enriquecimiento de la muestra **SCC**.

9.3. Análisis microbiológico con métodos moleculares

9.3.1. Análisis de ADN extraído

En el **Anexo VII** se presenta la relación 260 a 280 nm para verificar la pureza y la cuantificación del ADN extraído de las colonias puras obtenidas de cada muestra. En estas tablas podemos observar que, en general se obtuvo muy buen rendimiento de extracción de ADN de los microorganismos seleccionados de las dos muestras de sal en todos los medios de cultivo. También se obtuvo ADN de pureza aceptable, ya que la relación A_{260}/A_{280} muestra la proporción entre ADN/proteína que existe en la muestra, si este valor es ≥ 1.8 indica que existe una menor concentración de proteína en comparación con la cantidad del ADN extraído.

9.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Como se revisó previamente, esta técnica se fundamenta en la propiedad de la ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para ello emplea ciclos de temperaturas variables para separar las hebras de ADN recién formadas y enseguida, deja que la polimerasa vuelva a replicarlas (Madigan, *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2008).

Primero se realizó la amplificación de la región V3 del ARNr 16S del ADN extraído de las colonias seleccionadas. Para esta técnica se utilizaron cebadores para la región V3 del ARNr 16S, que anteriormente han sido utilizados en el grupo de trabajo para el estudio del queso Cotija. Estos cebadores son universales para dicha región, y se utilizan para realizar un análisis global de la diversidad y la dominancia de la población bacteriana de alguna muestra (Hernández, 2013; García-Saturnino, *et al.*, 2010; Zuñiga, 2009).

En el **Anexo VIII** de este trabajo, se presentan la concentración de ADN de los productos amplificados. Para todos los casos, se ajustó la concentración de ADN para agregar 200 ng/reacción.

En las **Figuras 23 y 24** se muestran algunos de los productos obtenidos de la PCR con un tamaño de 250 pb (debido a la adición de la grapa de GC). Además, los productos amplificados obtenidos fueron de calidad ya que sólo existe la presencia de una sola banda definida y no se observó barrido en ellas, que pudiera indicar algún tipo de degradación en el producto.

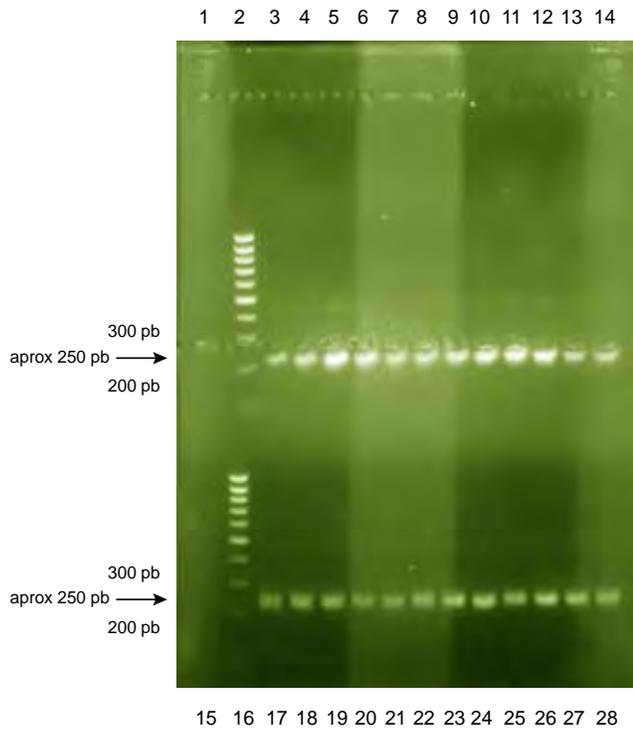


Figura 23.

Ejemplo de productos amplificados con la adición de grapa (GC), observados en un gel de agarosa al 2% (en Buffer TAE 1X) teñido con bromuro de etidio (1 μ L/10 mL de agarosa), 85 V por 45 min.

Se utilizó como marcador MassRuler™ Low Range.

Carril 1 y 15: Blanco de reacción.

Carril 2 y 16: Marcador de peso molecular.

Carril 3, 5, 7, 9, 11 y 13: Colonias obtenidas de la muestra **SMC** en medio XYP (colonias H-N).

Carril 4, 6, 8, 10, 12 y 14: Duplicado de reacción de las colonias H-N.

Carril 17, 19, 21, 23, 25 y 27: Colonias obtenidas de la muestra **SCC** en medio GYPB (colonias 22-26).

Carril 18, 20, 22, 24, 26 y 28: Duplicado de reacción de las colonias 22-26.

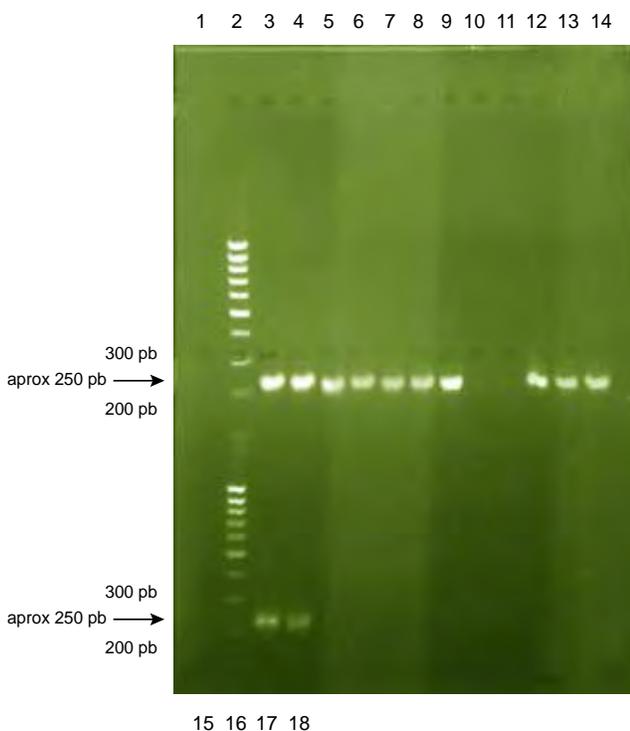


Figura 24.

Ejemplo de productos amplificados con la adición de grapa (GC), observados en un gel de agarosa al 2% (en Buffer TAE 1X) teñido con bromuro de etidio (1 μ L/10 mL de agarosa), 85 V por 45 min.

Se utilizó como marcador MassRuler™ Low Range.

Carril 1 y 15: Blanco de reacción.

Carril 2 y 16: Marcador de peso molecular.

Carril 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 17: Colonias obtenidas de la muestra **SMC** en medio GYPF (colonias O-U).

Carril 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 18: Duplicado de reacción de las colonias O-U.

9.3.3. DGGE (Electroforesis en gel con un gradiente desnaturizante)

Todos los productos obtenidos de la PCR fueron amplicones del mismo tamaño. La adición de la grapa rica en GC se realizó para evitar la disociación completa del ADN en la implementación de la electroforesis en gel con un gradiente desnaturizante (DGGE) y así, utilizando esta técnica, se logró visualizar la separación de los amplicones con base en la diferencia de su secuencia.

Con base en los resultados de Gómez, (2010), se decidió implementar un gradiente desnaturizante (urea y formamida) de 40-60%, con una electroforesis por 14 h a 80 V, ya que con estas condiciones se logró identificar ADN de bacterias halófilas presentes en el queso Cotija utilizando el método de DGGE. Sin embargo, como se muestra en la **Figura 25 a**, se obtuvo baja resolución de bandas, por ello se aumentó el gradiente desnaturizante a 30-70% con una electroforesis por 16 h a 80 V, con lo que se logró una satisfactoria separación de las bandas pero se concluyó que el tiempo de electroforesis tenía que reducirse por una hora, ya que la migración de las bandas se localizó al final del gel de acrilamida como se muestra en la (**Figura 25 b**).

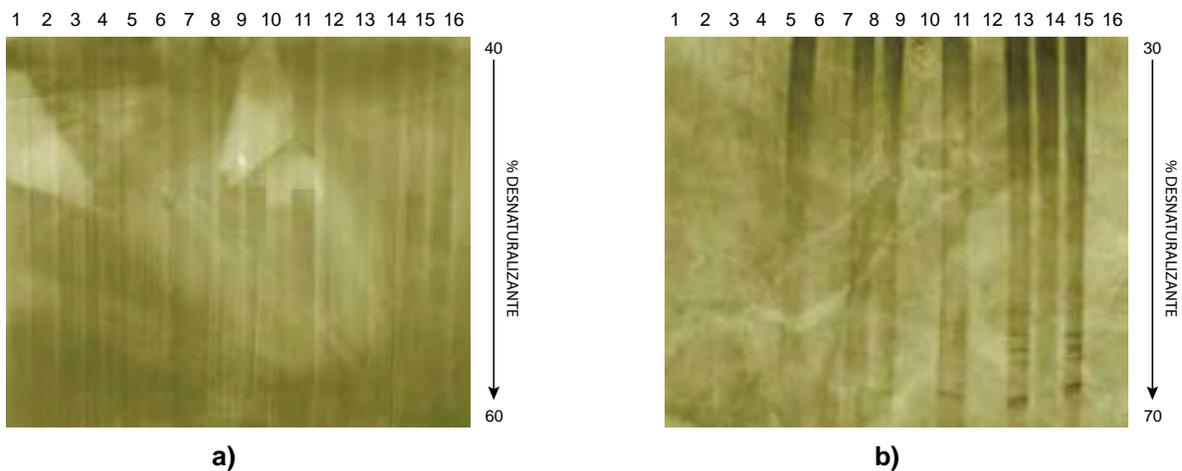


Figura 25. Perfiles de DGGE. Geles de poliacrilamida 8% teñidos con plata. Productos obtenidos de PCR de las colonias aisladas de la muestra **SCC** en medio GYPB.

- a) Gel con un gradiente desnaturizante 40-60%, 60°C a 80 V por 14h; Carriles 7-11 y 15-16.
- b) Gel con un gradiente desnaturizante 30-70%, 60°C a 80 V por 16h; Carriles 2, 5-6, 9, 11-13.

Con el fin de verificar la correcta realización del gradiente de desnaturalizantes, se utilizó azul de bromofenol y cianol de xileno (a una concentración final de $6.6 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$) agregados en la solución de alta densidad, durante la elaboración del gel. La metodología detallada se describe en el **Anexo II**.

En la **Figura 26** se observa un gradiente uniforme. En este gel se cargaron los amplicones y se separaron electroforéticamente.

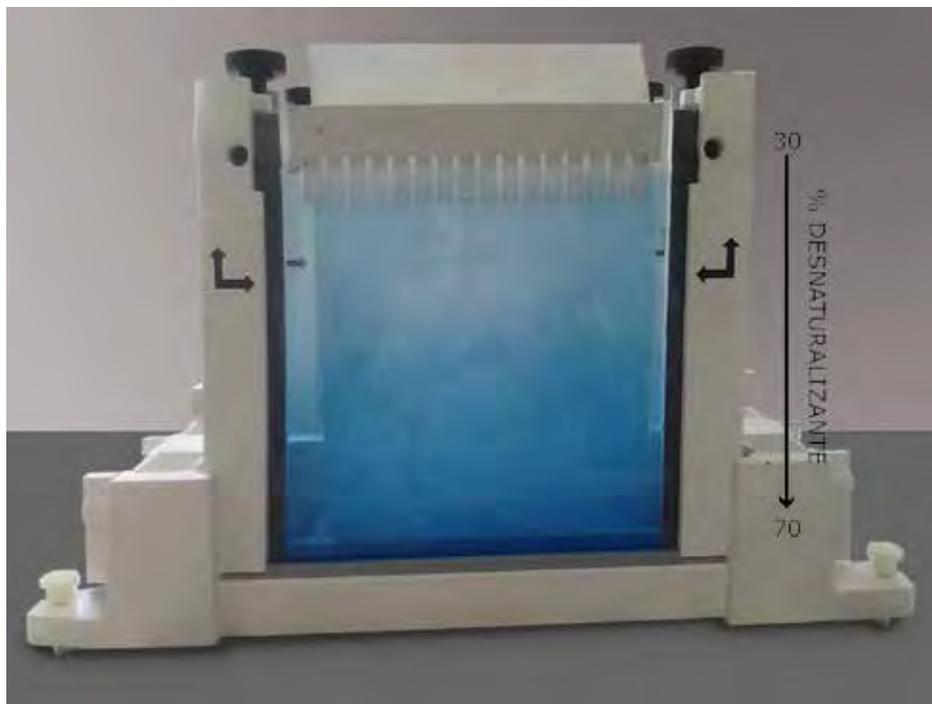


Figura 26. Gel de poliacrilamida al 8% teñido con azul de Bromofenol y cianol de xileno y con un gradiente desnaturalizante 30-70%.

9.3.3.1. Análisis de geles de DGGE

Se utilizó un gradiente desnaturante de 30-70% a 60°C con una electroforesis a 80 V por 15 h, con el cual se obtuvieron huellas génicas con una buena separación de las bandas como se muestran en las **Figuras 27 y 28**.

Perfiles de DGGE de la muestra SCC en diferentes medios de cultivo

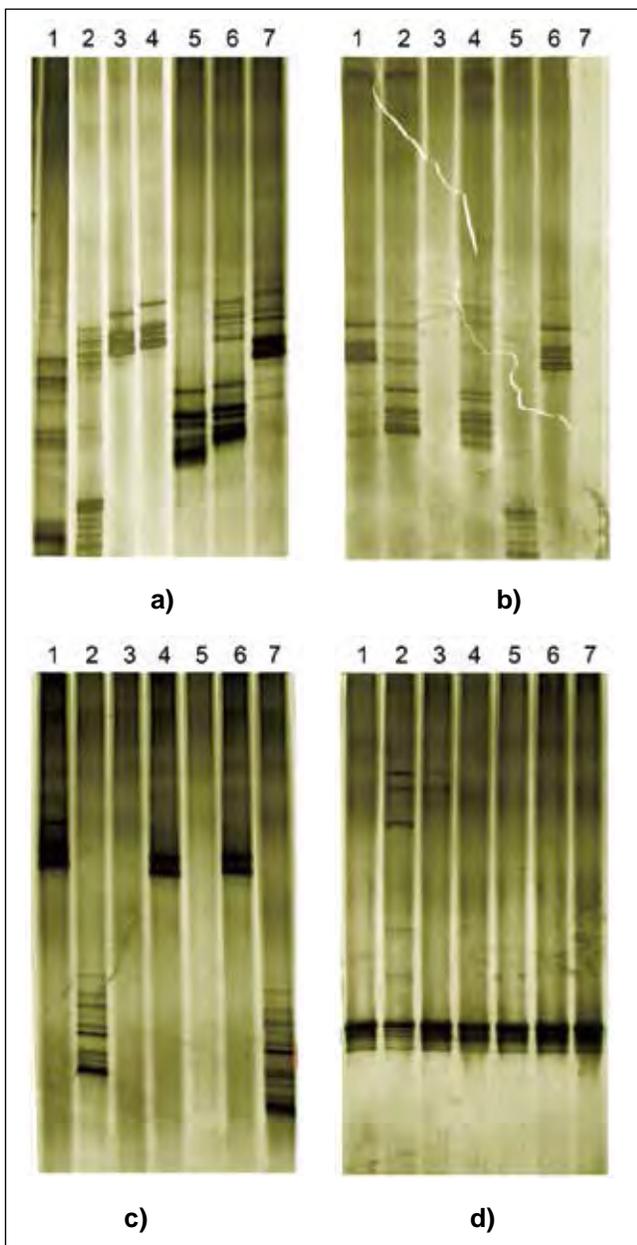


Figura 27.

Perfiles de DGGE. Geles de poliacrilamida 8% teñidos con plata. Gel con un gradiente desnaturante 30-70%, 60°C a 80 V por 15h. Productos obtenidos de PCR de los aislados de la muestra **SCC**.

- a) Medio GYP Carriles 1-7: Colonia 1-7.
- b) Medio XYP Carriles 1-7: Colonia 8-14.
- c) Medio GYPF Carriles 1-7: Colonia 15-21.
- d) Medio GYPB Carriles 1-7: Colonia 22-28

Perfiles de DGGE de la muestra SMC en diferentes medios de cultivo

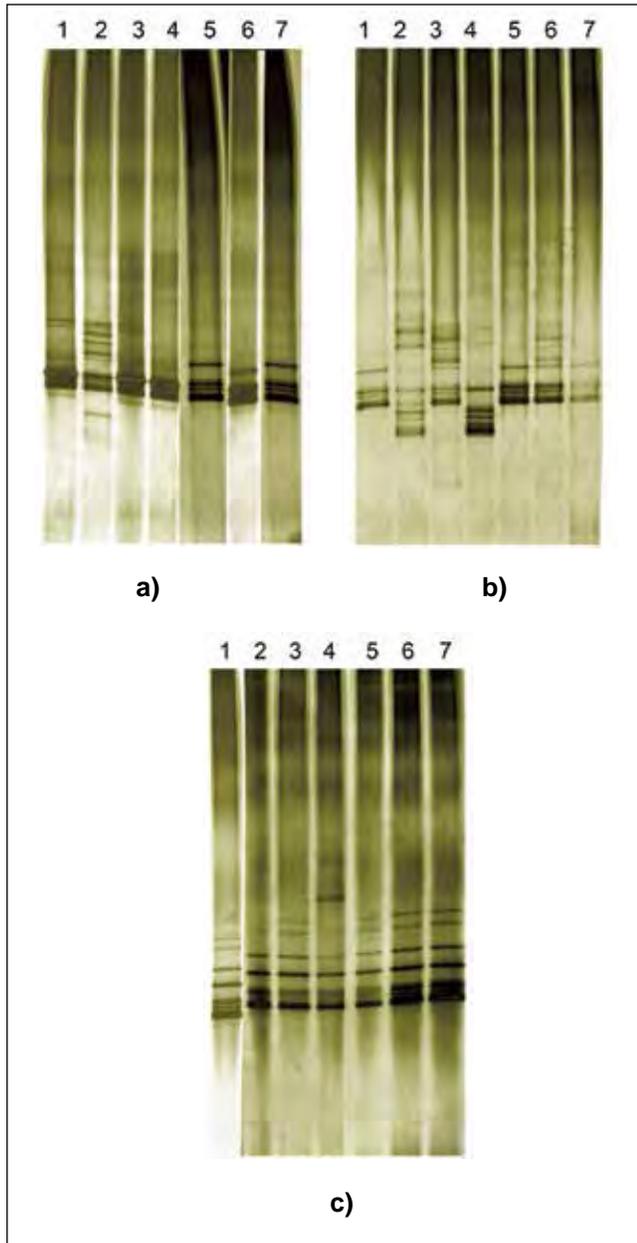


Figura 28.

Perfiles de DGGE. Geles de poliacrilamida 8% teñidos con plata. Gel con un gradiente desnaturalizante 30-70%, 60°C a 80 V por 15h. Productos obtenidos de PCR de los aislados de la muestra **SMC**.

- a) Medio GYP Carriles 1-7: Colonia A-G.
- b) Medio XYP Carriles 1-7: Colonia H-N.
- c) Medio GYPF. Carriles 1-7: Colonia O-U.

En el análisis de patrones de bandeo de DGGE obtenidos a partir de cultivos microbianos puros, hipotéticamente se debería obtener una sola banda porque esta metodología se fundamenta en que amplicones del mismo tamaño pero con diferente composición de nucleótidos, pueden ser separados al ser sometidos a un entorno desnaturalizante, ya que la migración de éstos en el gel dependen de su perfil diferencial de desnaturalización (T_m) y que es diferente para cada microorganismo. Sin embargo, en estudios sobre la microbiota presente en el queso Cotija que se han desarrollado dentro de nuestro grupo de trabajo utilizando esta técnica, se han obtenido perfiles de bandeo que inicialmente se ha supuesto que cada banda obtenida representa a un microorganismo diferente, pero en el momento de la secuenciación de amplicones se han identificado al mismo microorganismo con diferente migración en el gel. Este fenómeno es conocido como microheterogeneidad, el cual es la presencia de múltiple bandeo que exhibe una sola especie, ya que presenta múltiples copias de 16S del ADNr (Casillas, 2013; Estrada, 2009; Gómez, 2010; García, 2010).

Esta técnica se desarrolló con el fin de comparar los perfiles de bandeo obtenidos de cada colonia y generar un criterio de agrupamiento basado en que si dos colonias presentan el mismo perfil de bandeo, entonces estas dos colonias podrían ser el mismo microorganismo. (Casillas, 2013; Ercolini, 2004; Hedi, *et al.*, 2009).

La discriminación de bandas de los patrones obtenidos de cada colonia, se realizó tomando en cuenta los siguientes puntos:

1. Se seleccionó una banda por colonia.
2. Se seleccionaron bandas que se observaran concentradas y definidas.
3. En perfiles que presentaron migraciones similares entre colonias, se seleccionaron bandas que se encontraran a diferente altura.

Después se extrajo el ADN de las bandas seleccionadas de los geles de DGGE y se realizó la reamplificación siguiendo la metodología y condiciones descritas en el punto **8.4.3** de este trabajo. Se realizó la purificación de los productos de PCR y fueron concentrados a 10ng/μL para ser secuenciados por MACROGEN-Korea™.

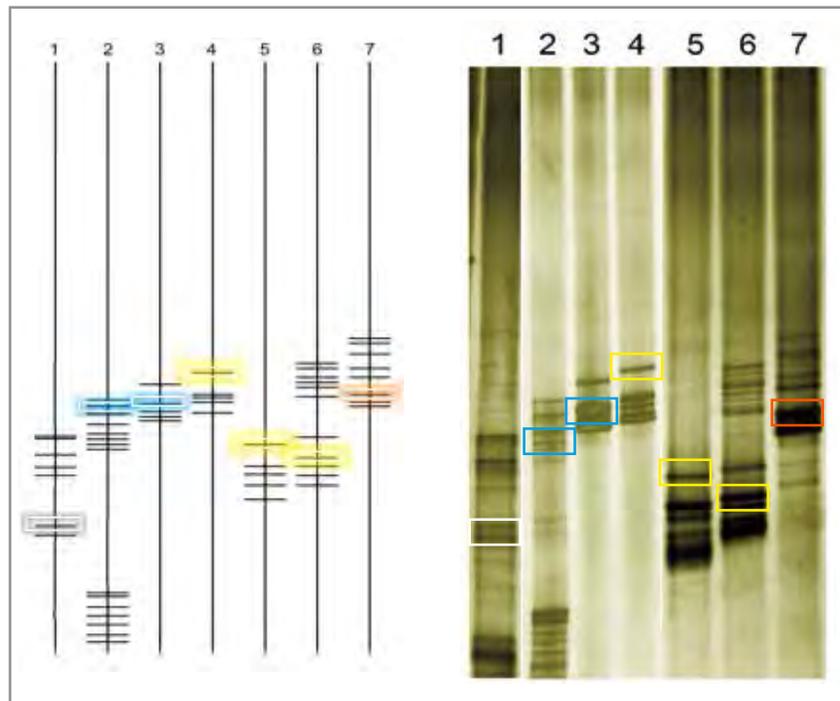
La comparación de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa BLAST para nucleótidos (Basic Local Alignment Search Tool) con ayuda del banco de datos NCBI (National Center of Biotechnology Information). Los alineamientos de las secuencias directa y reversa se generaron con apoyo del programa MulAlin 2000.



9.3.3.2. Análisis de selección de bandas e identificación molecular

Para este análisis, se dispuso a presentar las imágenes reales así como la representación digitalizada de la selección de bandas en los geles DGGE de las colonias aisladas de las dos muestras de sal.

Análisis de la muestra SCC en medio GYP



a)

Figura 29 a).

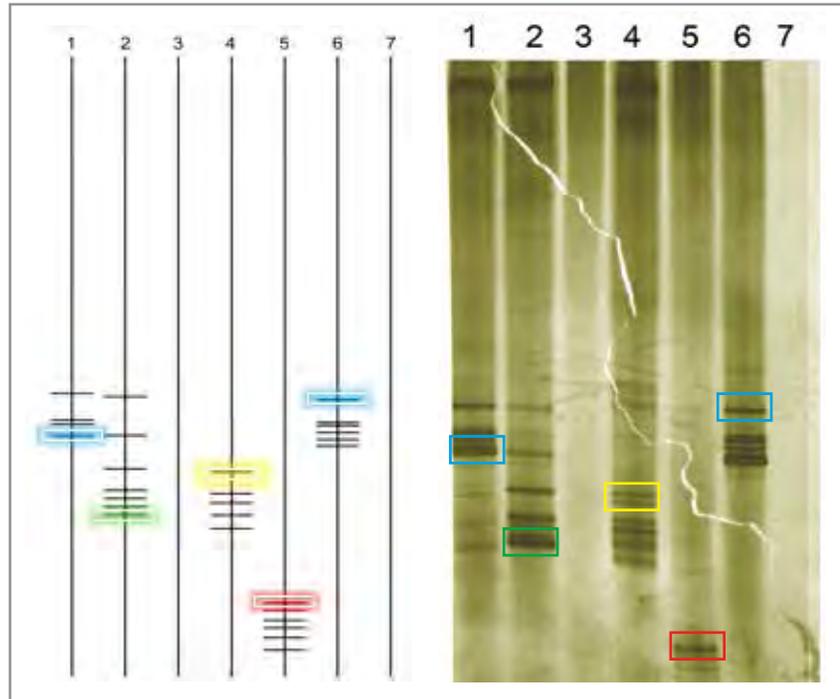
Perfiles de DGGE. Geles de poliacrilamida 8% teñidos con plata. Gel con un gradiente desnaturante 30-70%, 60°C a 80 V por 15h. Productos obtenidos de PCR de los aislados de la muestra **SCC**.

a) Medio GYP Carriles 1-7: Colonia 1-7.

Las bandas que fueron seleccionadas y secuenciadas están señaladas en recuadros de colores. Los porcentajes de identidad de cada colonia se presenta en la **Tabla 24**.

Blanco: No se logró amplificar;
Azul claro: *Virgibacillus dokdonensis*;
Naranja: *Bacillus flexus*;
Amarillo: Mismo porcentaje de identidad para
B. licheniformis/V. dokdonensis.

Análisis de la muestra SCC en medio XYP



b)

Figura 29 b).

Perfiles de DGGE. Geles de poliacrilamida 8% teñidos con plata.
Gel con un gradiente desnaturante 30-70%, 60°C a 80 V por 15h.
Productos obtenidos de PCR de los aislados de la muestra **SCC**.

b) Medio XYP Carriles 1-7: Colonia 8-14.

Las bandas que fueron seleccionadas y secuenciadas están señaladas en recuadros de colores. Los porcentajes de identidad de cada colonia se presenta en la **Tabla 24**.

Azul claro: *Virgibacillus dokdonensis*;

Verde: *Bacillus licheniformis*;

Rojo: Bacteria no cultivable;

Amarillo: Mismo porcentaje de identidad para
B. licheniformis/V. dokdonensis.

De la huella génica obtenida de la muestra **SCC** en medio GYP y XYP podemos decir que reflejan perfiles diferentes entre las colonias (**Figura 29 a y b**).

En la secuenciación de las bandas seleccionadas, pudimos identificar a *Virgibacillus dokdonensis* el cual tuvo un perfil similar para los dos medios de cultivo. Este microorganismo en medio GYP presentó colonias puntiformes, de color blanco, con bordes enteros y elevación plana; sin embargo en medio XYP, sus colonias se diferenciaron por ser colonias circulares y elevación convexa.

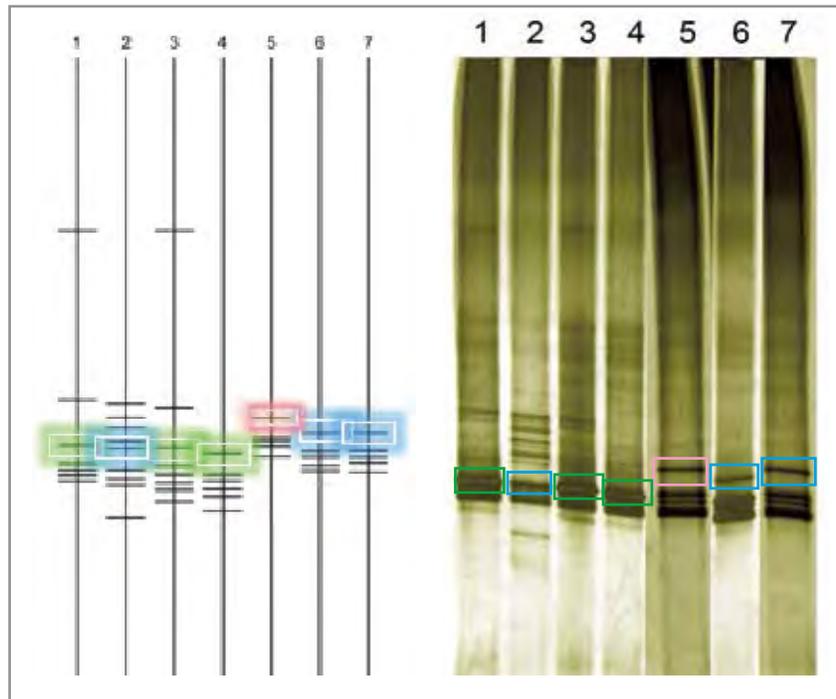
Otra semejanza que se halló en los perfiles de DGGE de estos dos medios de cultivo, fue que en las colonias 4, 5, 6 y 11 no se pudo diferenciar entre *B. licheniformis/V. dokdonensis*, ya que el amplicón obtenido tuvo la misma secuencia, por lo que se obtuvo el mismo porcentaje de identidad. Estas colonias presentaron las mismas características de crecimiento en los dos medios (circulares, de color blanco, con bordes enteros y elevación convexa).

En particular, en el medio GYP, se identificó a *Bacillus flexus*, y en XYP se encontró *Bacillus licheniformis*, estos microorganismos no se habían identificado con anterioridad en el grupo de trabajo. Las colonias de estos dos microorganismos se reportaron como circulares, de color blanco, con bordes ondulados y elevación convexa.

En medio XYP, la secuencia obtenida de la colonia 12, a partir del banco de datos NCBI se reportó con un 86% de identidad como bacteria no cultivable, identificada a partir de la secuenciación del ADNr 16S obtenido directamente de muestras de piel de niños con dermatitis atópica; sus colonias se mostraron como circulares, con bordes enteros, elevación plana y se caracterizaron por tener un color marfil (Kong, *et al.*, 2012).

Por otro lado, en medio XYP las colonias 10 y 14 (**Figura 29 b**, Carriles 3 y 7) no se observó alguna banda, lo que podría indicar que quizá la cuantificación de la cantidad de amplicón fue menor, lo que ocasionó que se cargara menor ADN de la necesaria para poder visualizarlo en el DGGE.

Análisis de la muestra SMC en medio GYP



a)

Figura 30 a).

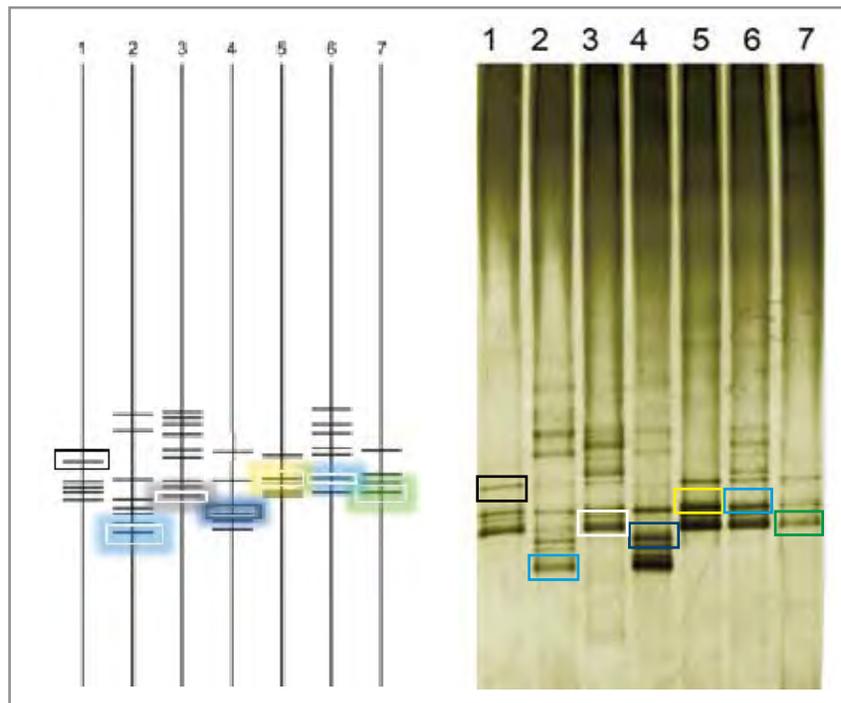
Perfiles de DGGE. Geles de poliacrilamida 8% teñidos con plata.
Gel con un gradiente desnaturalizante 30-70%, 60°C a 80 V por 15h.
Productos obtenidos de PCR de los aislados de la muestra **SMC**.

a) Medio GYP Carriles 1-7: Colonia A-G.

Las bandas que fueron seleccionadas y secuenciadas están señaladas en recuadros de colores. Los porcentajes de identidad de cada colonia se presenta en la **Tabla 25**.

Azul claro: *Virgibacillus dokdonensis*;
Verde: *Bacillus licheniformis*;
Rosa: *Virgibacillus halodenitrificans*.

Análisis de la muestra SMC en medio XYP.



b)

Figura 30 b).

Perfiles de DGGE. Geles de poliacrilamida 8% teñidos con plata. Gel con un gradiente desnaturante 30-70%, 60°C a 80 V por 15h. Productos obtenidos de PCR de los aislados de la muestra **SMC**.

b) Medio XYP Carriles 1-7: Colonia H-N.

Las bandas que fueron seleccionadas y secuenciadas están señaladas en recuadros de colores. Los porcentajes de identidad de cada colonia se presenta en la **Tabla 25**.

Azul claro: *Virgibacillus dokdonensis*;

Verde: *Bacillus licheniformis*;

Azul fuerte: *Bacillus* sp.;

Negro: No se encontró información de la secuencia obtenida en la base de datos;

Amarillo: Con mismo porcentaje de identidad para *V. halodenitrificans*/*B. licheniformis*.

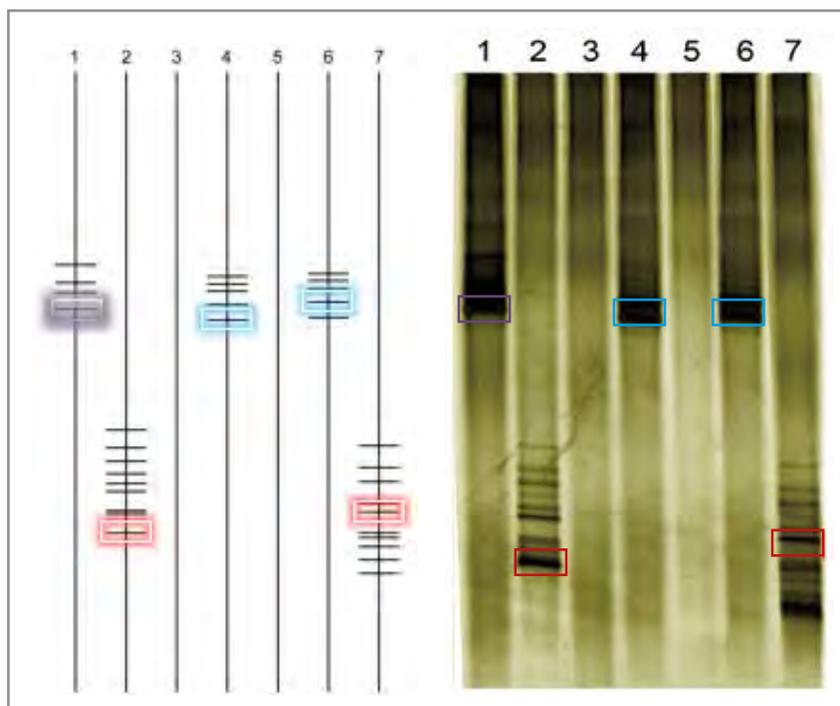
El perfil de bandeado obtenido de la muestra **SMC** en medios GYP y XYP fueron muy semejantes entre colonia y entre los medios de cultivo.

En los dos medios de cultivo se identificó a *Bacillus licheniformis*. Este microorganismos en los dos medios, presentó el mismo perfil de bandeado y mismas características coloniales (circulares, de color blanco, con bordes ondulados y elevación convexa). De igual manera, en los dos medios de cultivo se identificaron a *Virgibacillus dokdonensis*, sin embargo este microorganismo mostró diferentes perfiles de bandeado y características de crecimiento colonial.

En el medio de cultivo GYP, se identificó con un 98% de identidad a la colonia E como *Virgibacillus halodenitrificans* (**Figura 30 a**, carril 5), este perfil fue muy semejante que el obtenido con de *V. dokdonensis* en este medio de cultivo; sin embargo, en el medio XYP (**Figura 30 b**, carril 5) la colonia L mostró el mismo comportamiento de bandeado, pero no se pudo diferenciar entre *B. licheniformis/V. halodenitrificans* al tener el mismo porcentaje de identidad. Las características de crecimiento de estas colonias fueron diferentes en la elevación y bordes.

Por último, en este último medio de cultivo, se identifico a la colonia K, como *Bacillus* sp. con una huella génica diferente a las demás (**Figura 30 b**, carril 4) pero presentó características coloniales semejantes a las de *B. licheniformis*.

Análisis de la muestra SCC en medio GYPF



a)

Figura 31 a).

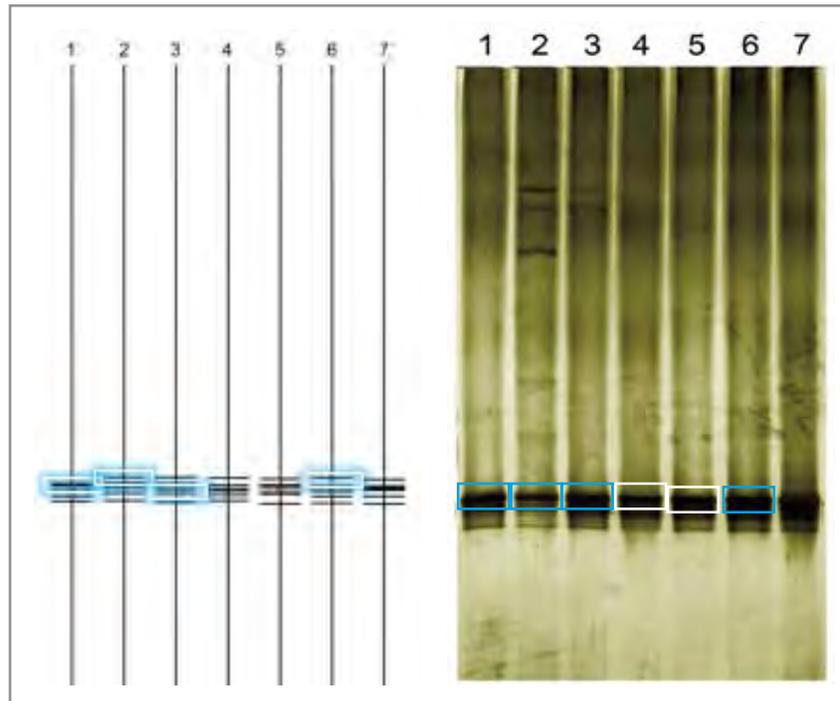
Perfiles de DGGE. Geles de poliacrilamida 8% teñidos con plata.
Gel con un gradiente desnaturante 30-70%, 60°C a 80 V por 15h.
Productos obtenidos de PCR de los aislados de la muestra **SCC**.

a) Medio GYPF Carriles 1-7: Colonia 15-21.

Las bandas que fueron seleccionadas y secuenciadas están señaladas en recuadros de colores. Los porcentajes de identidad de cada colonia se presenta en la **Tabla 24**.

Morado: *Aerococcus viridans*;
Azul claro: *Virgibacillus dokdonensis*;
Rojo: Bacteria no cultivable.

Análisis de la muestra SCC en medio GYPB



b)

Figura 31 b).

Perfiles de DGGE. Geles de poliacrilamida 8% teñidos con plata.
Gel con un gradiente desnaturante 30-70%, 60°C a 80 V por 15h.
Productos obtenidos de PCR de los aislados de la muestra **SCC**.

b) Medio GYPB Carriles 1-7: Colonia 22-28.

Las bandas que fueron seleccionadas y secuenciadas están señaladas en recuadros de colores. Los porcentajes de identidad de cada colonia se presenta en la **Tabla 24**.

Blanco: No se logró amplificar;
Azul claro: *Virgibacillus dokdonensis*.

Se observó que la microbiota de las dos muestras de sal encontró limitantes para desarrollarse en los medios GYPF y GYPB y que las características de sus aislados fueron muy semejantes entre sí, por lo que era posible que se identificaran a microorganismos similares. En los dos medios de cultivo, se identificó con mayor abundancia *Virgibacillus dokdonensis* con casi 100% de identidad, a pesar de que no se observó el mismo patrón de bandeo.

Todas las colonias de la muestra **SCC** en medio GYPB fueron identificadas como *Virgibacillus dokdonensis* y su perfil de bandeo y características coloniales fueron idénticas entre ellos (**Figura 31 b**).

En medio GYPF las colonias 18 y 20 también resultaron ser *V. dokdonensis* y estos dos perfiles fueron similares entre sí, pero diferentes a los observados en medio GYPB. Todas las colonias de este microorganismo en los dos medios, se reportaron como circulares o puntiformes, de color blanco, con bordes enteros y elevación plana; sin embargo, se diferenciaron en que sus colonias sobre el recubrimiento en medio GYPF se observaron de color rosa, mientras que en medio GYPB fueron blancas. Estas diferencias pudieran indicar que son cepas diferentes y que por esta razón las localizamos con distinto perfil de desnaturalización (**Figura 31 a**, carriles 4 y 6).

Se identificó a la colonia 15 como *Aerococcus viridans* con un 99% de identidad (**Figura 31 a**, carril 1). Este microorganismo ha sido aislado en langostas con “*gaffkemia*” en aguas costeras de Estados Unidos y Europa. Causa una enfermedad que induce la muerte en las langostas, pero no es considerado un microorganismo patógeno para humanos. Esta enfermedad provoca grandes pérdidas económicas en la pesca, sin embargo, también se ha reportado que existen cepas no virulentas para las langostas. Este microorganismo ha sido descrito como microaerobio y halófilo moderado ya que puede crecer en concentración de NaCl de 6.5% (p/v). Cabe mencionar que *A. viridans* está reportado como coco Gram-positivo, sin embargo sus características coloniales de este trabajo no se mostraron diferentes a las demás y en la tinción de Gram se observaron bacilos cortos Gram- positivo lo que será necesario realizar otras pruebas para confirmar su presencia (Kerbaugh, *et al.*, 1968; Spencer, *et al.*, 2005).

Por otro lado, en medio GYPF las colonias 17 y 19 (**Figura 31 a**, Carriles 3 y 5) no se observaron bandas definidas, lo que podría indicar que para estas colonias se tendrían que modificar las condiciones de electroforesis de DGGE. Además, se encontraron dos perfiles similares entre las colonias 16 y 20 del medio GYPF (**Figura 31 a**, Carriles 2 y 7), y a partir del banco de datos se reportaron como bacteria no cultivable (<90% de identidad) al igual que la colonia 12 de esta muestra (**SCC**) en medio XYP (Kong, *et al.*, 2012).

Análisis de la muestra SMC en medio GYPF

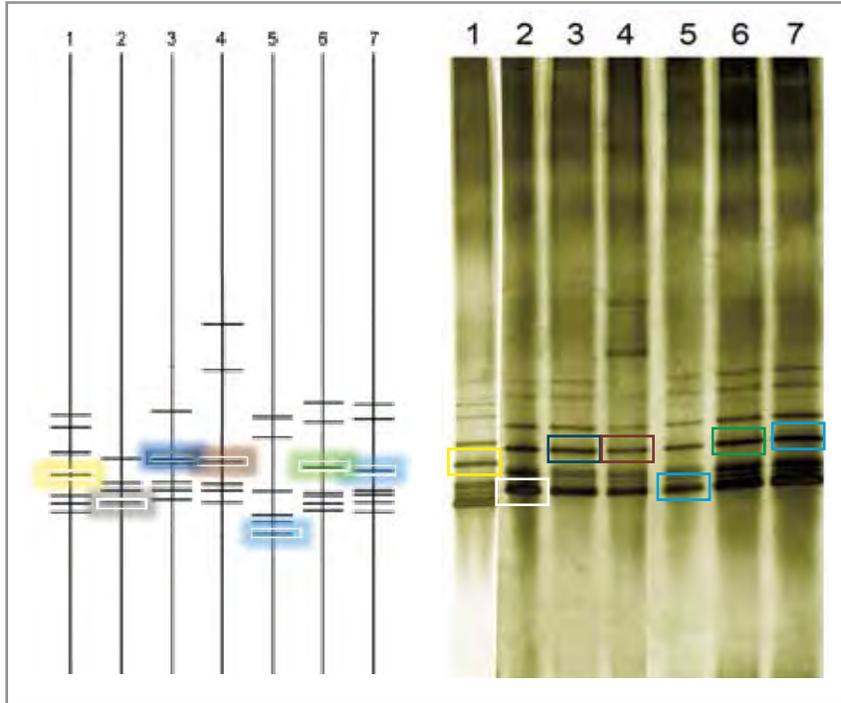


Figura 32.

Perfiles de DGGE. Geles de poliacrilamida 8% teñidos con plata. Gel con un gradiente desnaturalizante 30-70%, 60°C a 80 V por 15h. Productos obtenidos de PCR de los aislados de la muestra **SMC**.

En medio GYPF. Carriles 1-7: Colonia O-U.

Las bandas que fueron seleccionadas y secuenciadas están señaladas en recuadros de colores. Los porcentajes de identidad de cada colonia se presenta en la **Tabla 25**.

- Blanco: No se logró amplificar;
- Azul claro: *Virgibacillus dokdonensis*;
- Verde: *Bacillus licheniformis*;
- Café: *Bacillus megaterium*;
- Azul fuerte: *Bacillus* sp.;
- Amarillo: Con mismo porcentaje de identidad para *V. halodenitrificans/V. dokdonensis/B. licheniformis*.

Por último, sobre la huella génica obtenida de la muestra **SMC** en medio GYPF, se observaron perfiles semejantes entre sí, sin embargo, la secuenciación de las bandas mostró identidades diferentes para casi todas ellas.

Primero se identificó como a la colonia S y U como *Virgibacillus dokdonensis* y sus perfiles fueron semejantes entre sí. Por otro lado, se observó un perfil muy similar al obtenido con este microorganismo a las colonias Q, R y T sin embargo, fueron identificadas como *Bacillus sp.*, *B. megaterium* y *B. licheniformis* respectivamente. Además, la colonia O también se comportó muy semejante a ellas, pero no se logró diferenciar entre *V. halodenitrificans/V. dokdonensis/B.licheniformis*. En general las características coloniales que presentaron los aislados de la muestra **SMC** en este medio, se diferenciaron en la elevación que presentaron las colonias que se desarrollaron en la parte superior del recubrimiento.

El perfil de *Bacillus megaterium* se diferenció en tener dos bandas concentradas a diferente altura de los demás perfiles de migración. *B. megaterium* no se había reportado con anterioridad, al igual que *Bacillus flexus* (identificado en la colonia 7 de la muestra **SCC** en medio **GYP**). Las colonias de estos dos microorganismos se presentaron como circulares, de color blanco, convexas y con bordes enteros ondulados. Estos microorganismos son bacilos Gram-positivo, formadoras de espora, forman ácido a partir de glucosa y se han reportado con comportamientos muy similares pero difieren en que *B. flexus* son células mucho más pequeñas, ya que *B. megaterium* significa “la gran bestia” y fue nombrado así por su gran tamaño. Estos dos microorganismos se han identificado en muestras del suelo, en especial *B. megaterium* en suelos de agua de mar, muestras de pescado y alimentos secos. (Dietz, *et al.*, 1918; Patricia, *et al.*, 2007; Priest, *et al.*, 1988).

En las **Tablas 24 y 25** se presentan los microorganismos identificados y sus correspondientes porcentajes de identidad obtenida a partir de la comparación con la base de datos del NCBI, además se indica el valor E y el %cobertura con respecto a la región V3 del microorganismos obtenido de la base de datos. Las bacterias aisladas de la muestras de sal están identificadas con números (**SCC**) y con letras (**SMC**). Los super índices indican la identidad determinada de acuerdo a la relación filogenética de las bacterias halófilas aisladas de las dos muestras de sal de grano (**Figura 33**).

Tabla 24. Resultados de secuenciación de los aislados de la muestra **SCC**.

SCC				
Nombre	Microorganismos	% ID	E	% Cobertura
GYP				
1	-	-		
2	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	96 %	7e ⁻⁶⁴	34.5 %
3	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	97 %	3e ⁻⁶²	36.6 %
4 ^{Vd.}	<i>Bacillus licheniformis/ Virgibacillus dokdonensis</i>	96 %	7e ⁻⁵⁹	35.8 %
5 ^{Vd.}	<i>Bacillus licheniformis/ Virgibacillus dokdonensis</i>	96 %	7e ⁻⁵⁹	35.8 %
6 ^{Vd.}	<i>Virgibacillus dokdonensis/ Bacillus sp.</i>	94 %	6e ⁻⁵⁵	34.2 %
7	<i>Bacillus flexus</i>	100 %	4e ⁻⁶¹	35.3 %
XYP				
8	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	95 %	1e ⁻⁵⁶	36.1 %
9 ^{Vd.}	<i>Bacillus licheniformis</i>	94 %	4e ⁻²⁹	22.7 %
10	-	-	-	-
11 ^{Vd.}	<i>Bacillus licheniformis/ Virgibacillus dokdonensis</i>	93 %	2e ⁻⁴⁹	34.2 %
12	Bacteria No Cultivada	86 %	4e ⁻¹⁶	4.0 %
13	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	99 %	9e ⁻⁶⁸	41.8 %
14	-	-	-	-
GYPF				
15	<i>Aerococcus viridans</i>	99 %	4e ⁻⁶⁶	30.9 %
16	Bacteria No Cultivada	86 %	7e ⁻¹⁴	3.9 %
17	-	-	-	-
18	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	96 %	1e ⁻³⁶	42.1 %
19	-	-	-	-
20 ^{Sc.}	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	97 %	2e ⁻⁵⁴	33.4 %
21	Bacteria No Cultivada	88 %	9e ⁻¹³	8.7 %
GYPB				
22	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	100 %	3e ⁻⁶⁷	36.8 %
23	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	97 %	3e ⁻⁷³	40.0 %
24	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	100 %	3e ⁻⁷³	40.0 %
25	-	-	-	-
26	-	-	-	-
27 ^{Sc.}	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	95 %	7e ⁻⁴³	28.9 %
28	-	-	-	-

Vd. *Virgibacillus dokdonensis*

Sc. Sin confirmar identidad

Tabla 25. Resultados de la secuenciación de los aislados de la muestra **SMC**

SMC				
Nombre	Microorganismos	% ID	E	% Cobertura
GYP				
A	<i>Bacillus licheniformis</i>	100 %	1e ⁻⁷⁰	34.5 %
B	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	96 %	4e ⁻⁵⁶	35.0 %
C	<i>Bacillus licheniformis</i>	99 %	4e ⁻⁷⁶	42.6 %
D	<i>Bacillus licheniformis</i>	94 %	7e ⁻⁶⁵	39.7 %
E	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	98 %	9e ⁻⁶³	37.1 %
F	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	96 %	8e ⁻⁴³	36.6 %
G	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	98 %	2e ⁻⁶⁰	36.1 %
XYP				
H	No se encontró similitud en la base de datos de NCBI	-	-	-
I	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	98 %	5e ⁻⁷⁰	39.5 %
J	-	-	-	-
K ^{Sc.}	<i>Bacillus sp.</i>	97 %	3e ⁻⁴¹	23.0 %
L ^{Vh.}	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i> / <i>Bacillus licheniformis</i>	97 %	7e ⁻⁵⁴	33.2 %
M ^{Vh.}	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	94 %	1e ⁻⁶¹	39.2 %
N	<i>Bacillus licheniformis</i>	99 %	5e ⁻⁷⁰	39.5 %
GYPF				
O ^{Vh.}	<i>V. halodenitrificans</i> / <i>V. dokdonensis</i> / <i>B. licheniformis</i>	96 %	2e ⁻⁶⁰	37.4 %
P	-	-	-	-
Q ^{Vd.}	<i>Bacillus sp.</i>	91 %	8e ⁻³⁹	22.4 %
R	<i>Bacillus megaterium</i>	99 %	3e ⁻⁶⁷	39.2 %
S	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	94 %	1e ⁻⁵¹	34.7 %
T ^{Vd.}	<i>Bacillus licheniformis</i> / <i>Virgibacillus dokdonensis</i>	96 %	8e ⁻⁵⁸	35.3 %
U	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	96 %	6e ⁻⁵⁶	39.5 %

Vd. *Virgibacillus dokdonensis*

Vh. *Virgibacillus halodenitrificans*

Sc. Sin confirmar identidad

Comparación de los perfiles obtenidos por muestra SCC vs SMC

En general existió una predominancia en las dos muestras de sal de grano de los géneros identificados como *Bacillus* y *Virgibacillus*, siendo este último el de mayor abundancia.

El género *Bacillus* se ha identificado en el queso Cotija, al respecto García, (2010) concluyó que este microorganismo puede ser incorporado en el proceso de salado. Así pues, este género se identificó en las dos muestras de sal pero se mostró mayoritariamente en la comunidad aislada de la muestra **SMC**. En general, el género *Bacillus* se reporta como aerobio estricto; sin embargo, en este trabajo lo identificamos en los medios GYPF y GYPB que contenían reactivos que favorecerían condiciones de microaerobiosis. Su presencia en estos medios se justifica ya que no se encontraban en condiciones estrictas de anaerobiosis y que estos microorganismos son formadores de esporas por lo que son más resistentes a sobrevivir en condiciones no óptimas para ellos.

Un miembro de este género que fue identificado fue *Bacillus licheniformis*, este microorganismo es bacilo Gram-positivo, formador de spora, halófilo moderado y se ha identificado en alimentos fermentados. En este trabajo se observó que sus perfiles de migración en DGGE se asemejaban entre sí; además, todas sus colonias presentaron las mismas características sin importar en el medio de cultivo que se desarrollaron. Además, estas colonias se observaron como circulares, de color blanco, con bordes ondulados y elevación convexa.

Por su parte, Casillas, en el 2013 identificó por primera vez en el grupo de trabajo la presencia de *Virgibacillus* implementando la técnica de DGGE. Este microorganismo está descrito como Gram-positivo, aeróbico, catalasa positiva y crece en un rango de pH de 5.8-9.6. Y se podría encontrar en el queso Cotija por el uso de sal marina en su elaboración, ya que este género es reportado como halófilo moderado ya que crece en altas concentraciones de sal [12-23% (p/v)] y ha sido aislado de muestras de carne de pescado, agua y sal marina.

En esta investigación, dentro del género *Virgibacillus* se identificó de forma particular en la muestra **SMC** es a *V. halodenitrificans*, este microorganismo ha sido reportado en evaporadores de agua de mar por lo que es posible identificarlo en las muestras de sal de grano; aunado a ello es formador de esporas, Gram-variable y es considerado como halófilo moderado ya que crece en un amplio rango de concentración de NaCl que va de 2-23% (p/v), pero óptimamente de 3-7% (p/v) de NaCl. Las colonias de este microorganismo se caracterizaron por ser circulares de color blanco, con elevación convexa y bordes enteros.

Por otra parte, se identificó en mayor abundancia a *Virgibacillus dokdonensis* en las dos muestras de sal (13 colonias de la muestra **SCC** y 7 colonias de **SMC**). *V. dokdonensis* está reportado como un bacilo Gram-variable, móvil, formador de esporas. Y está considerado como un halófilo ligero ya que crece de manera óptima en un rango de 4-5% (p/v) de NaCl. Este microorganismo ha sido aislado en agua de mar por lo que justifica la presencia en las muestras de sal. Cabe mencionar que algunas de las colonias que se identificaron como *V. dokdonensis* mostraron perfiles diferentes de desnaturalización y en general sus colonias se mostraron muy diferentes en todos los medios de cultivo, lo que podría indicar que se tratan de cepas diferentes.

En estos dos últimos microorganismos mencionados se reporta que pueden crecer en condiciones de anaerobiosis, por lo que hace posible identificarlo en los cuatro medios de cultivo que se utilizaron (Yoon, *et al.*, 2004; Yoon, *et al.*, 2005).

Por último se realizó un árbol filogenético que se construyó a partir de la secuenciación de la región V3 de ADNr provenientes de las bandas obtenidas de DGGE, utilizando el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 5.2. Se construyó este árbol (**Figura 33**) para determinar la relación filogenética existente entre las bacterias halófilas que se aislaron de las dos muestras de sal y otras secuencias que se obtuvieron del GenBank utilizando como grupo externo a *E. coli*. Cabe mencionar que se realizó este análisis de agrupamiento bajo el método Neighbor-Joining.

No se utilizaron las secuencias reportadas como no cultivables (Colonias 12, 16 y 21 de la muestra **SCC**) y las colonias 20, 27 y K de la muestra **SMC** ya que su longitud no fue suficiente para llevar a cabo el análisis.

En la **Figura 33** se lograron ubicar las colonias aisladas y las cepas de referencia en cuatro grupos:

1. *Bacillus megaterium* y *Bacillus flexus*;
2. *Virgibacillus dokdonensis*;
3. *Bacillus licheniformis*; y
4. *Virgibacillus halodenitrificans*.

Las colonias identificadas como *B. megaterium*, *B. flexus* y sus respectivas cepas de referencia se agruparon con un alto valor de confianza de nodo. De igual manera, se observa un grupo de las colonias identificadas como *B. licheniformis*.

La colonia B identificado por alineamiento como *Virgibacillus dokdonensis* se ubicó lejos de este grupo, por lo que es necesario complementar con pruebas fenotípicas para determinar su identidad.

En el alineamiento de las colonias 4, 5, 6 y 11 de la muestra **SCC** y las colonias L, O y T de la muestra **SMC** no se pudieron diferenciar de los géneros *Virgibacillus/Bacillus* al tener el mismo porcentaje de identidad. Sin embargo en la **Figura 33** se observó la agrupación de las colonias 4, 5, 6, 11 y T con *Virgibacillus dokdonensis*; además, hubo un reagrupamiento de las colonias Q y 9 con este mismo microorganismo. Por otro lado, la colonia L y O se agruparon con *V. halodenitrificans* y se reagrupó la colonia M. Estos tres microorganismos son productores de ácido láctico a partir de glucosa, *V. dokdonensis* y *V. halodenitrificans* también lo producen a partir de galactosa, por lo pudieran intervenir directamente a la fermentación del queso Cotija.

Se realizó un alineamiento de la región V3 del 16S ARNr entre *V. dokdonensis*, *V. halodenitrificans* y *B. licheniformis* con el programa Clustal Omega para conocer el porcentaje de identidad entre estos microorganismos (**Figura 34**). Este análisis señaló que estos microorganismos tienen un alto porcentaje de identidad en esta región.

CLUSTAL 0(1.2.0) multiple sequence alignment

```

gi527910688_Bacillus_licheniformis_CIAD-1      GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTA
gi528790899_Virgibacillus_dokdonensis_JAN-2    GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTA
gi526131176_Virgibacillus_halodenitrificans_BMGED33
*****

gi527910688_Bacillus_licheniformis_CIAD-1      AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACC-TGACGGTACC
gi528790899_Virgibacillus_dokdonensis_JAN-2    AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGTTGGCACCTTGACGGTACC
gi526131176_Virgibacillus_halodenitrificans_BMGED33
AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTCGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACC
** .*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

gi527910688_Bacillus_licheniformis_CIAD-1      TAACCAGAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
gi528790899_Virgibacillus_dokdonensis_JAN-2    TAACCAGAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
gi526131176_Virgibacillus_halodenitrificans_BMGED33
TAACCAGAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
*****.*****.*****.*****.*****

```

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

	<i>B.licheniformis</i>	<i>V.dokdonensis</i>	<i>V.halodenitrificans</i>
gi527910688_Bacillus_licheniformis_CIAD-1	100.00	94.84	96.13
gi528790899_Virgibacillus_dokdonensis_JAN-2	94.84	100.00	97.44
gi526131176_Virgibacillus_halodenitrificans_BMGED33	96.13	97.44	100.00

Figura 34. Porcentajes de identidad y alineamiento de la región V3 del 16S ARNr de los microorganismos *V. dokdonensis*, *V. halodenitrificans* y *B. licheniformis* con Clustal omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>).

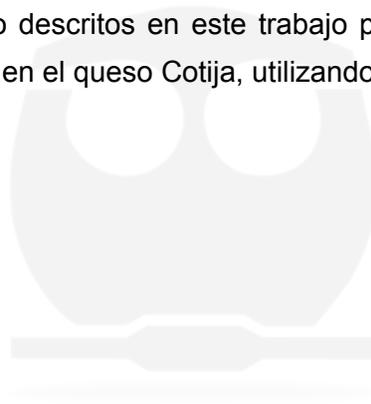
De acuerdo a lo observado en la **Figura 33**, podemos decir que la mayoría de los microorganismos se agruparon de acuerdo a los resultados del análisis BLAST, además que se estableció la identidad de las colonias que no se habían podido diferenciar por BLAST. La mayoría de las colonias aisladas de las dos muestras de sal fueron identificadas y agrupadas como *Virgibacillus dokdonensis*. Sin embargo, es muy importante tomar en cuenta que *V. dokdonensis*, *V. halodenitrificans* y *B. licheniformis* comparten un $\geq 95\%$ de identidad en esta región, por lo que la secuenciación de la región V3 del 16S ARNr no es suficiente para asegurar su identidad, por lo que se considera necesario realizar una amplificación del 16S ARNr completo para asegurar su identidad, además de completar un análisis fenotípico.

X. CONCLUSIONES

- Se observó la importancia de los métodos microbiológicos tradicionales, complementados con métodos moleculares, para la identificación de algunas bacterias aisladas de sal de grano.
- La microbiota de las dos muestras de sal, sin importar su origen, fue compuesta principalmente por microorganismos esporulados, principalmente de los géneros *Virgibacillus* y *Bacillus*. A pesar de que se utilizaron diferentes medios de cultivo, se observó que estos dos géneros fueron capaces de crecer en ellos.
- El microorganismo presente en mayor abundancia en las dos muestras de estudio se identificó como: *Virgibacillus dokdonensis*.
- Los medios GYP y XYP resultaron ser los medios de cultivo menos costosos, más rápidos de preparar y fáciles de utilizar y permitieron el cultivo de una población microbiana similar.
- A pesar de que se observaron especies comunes en las muestras de sal, su perfil de DGGE fue diferente entre ellas, lo que pudiera indicar que pertenecen a diferentes cepas.
- La presencia de *Bacillus megaterium* fue particular de la muestra **SMC**, mientras que en la muestra **SCC** se identificó a *Bacillus flexus*.
- En la muestra **SCC** se observó un mayor presencia de UFCs; sin embargo, no se logró identificar gran diversidad de microorganismos; cabe señalar que cuatro colonias aisladas no mostraron perfil de DGGE; además, las colonias que de acuerdo al banco de datos NCBI fueron reportadas como no cultivables, mostraron diferentes perfiles, lo que podría indicar que pudiera ser posible identificar mayor diversidad de microorganismos en esta muestra.
- Hallamos diferencias en las unidades de ensayo con la utilización de los métodos microbiológicos tradicionales y con los moleculares, lo cuales indican que, a pesar de que predominantemente los aislados de las muestras de sal fueron identificados con el mismo género y especie, reflejan ser cepas diferentes. Además, se identificaron en menor abundancia a otros microorganismos característicos de cada muestra de sal. Por lo tanto, en los productos fermentados, como el queso Cotija en donde se sabe que la sal es una fuente de microorganismos, el tipo de sal sí puede influir en la microbiota inoculada a partir del salado.

XI. PERSPECTIVAS

- Es de interés la utilización de estos medios de cultivo a diferentes concentraciones de NaCl para examinar mejor la diversidad bacteriana halófila presente en las muestras de sal, para identificar la presencia de otros microorganismos ligeramente halófilos de interés.
- Realizar en el medio GYPB un aislamiento a partir de un enriquecimiento con menor tiempo de muestreo.
- Es necesario amplificación del 16S del ARN ribosomal para lograr identificar certeramente algunos microorganismos en las muestras de sal, cuya identidad fue dudosa.
- Utilizar los medios de cultivo descritos en este trabajo para el aislamiento e identificación de bacterias halófilas presentes en el queso Cotija, utilizando diferentes concentraciones de NaCl.



XII. ANEXOS

ANEXO I

Conservación de colonias a largo plazo por congelación.

- 1 Cultivar en tubos de centrifuga de 50 mL por 24 horas el microorganismo de interés en medio líquido óptimo y condiciones adecuadas de temperatura y requerimientos de oxígeno.
- 2 Preparar y esterilizar tubos viales con cuentas perforadas en su interior (chaquiras).
- 3 Esterilizar medio de cultivo óptimo con glicerol al 15%.
- 4 Centrifugar los microorganismos a 1, 261x g durante 20 minutos.
- 5 Realizar dos lavados de pellet con 500 µL de solución peptonada al 0.1%.
- 6 Resuspender pellet en 3 mL de medio con glicerol y homogeneizar perfectamente.
- 7 Transferir 2 mL a cada vial estéril o hasta que cubra todas las chaquiras, evitando la formación de burbujas.
- 8 Retirar excedente.
- 9 Congelar a -20°C.

ANEXO II

Composición de soluciones para geles de DGGE

Tabla II.1) Solución de Acrilamida/ Bis-acrilamida al 40%.

Reactivo	Cantidad
Acrilamida	38.93 g
Bis-Acrilamida	1.07 g
dH ₂ O	cbp 100 mL

Filtrar a través de una membrana de 0.45 µm y almacenar a 4 °C.

Tabla II.2) Composición de las soluciones desnaturalizantes.

Reactivo	30 %	70 %
Acrilamida 40%	20 mL	20 mL
Buffer TAE 50X	2 mL	2 mL
Urea	12 g	28 g
Formamida	12.6 mL	29.4 mL
dH ₂ O	cbp 100 mL	

Desgasificar por 10-15 min. Filtrar a través de una membrana de 0.45 µ.
Almacenar a 4 °C en frascos ámbar no más de 1 mes.
Concentración final del gel 8%.

Tabla II.3) Solución de Persulfato de amonio (APS) 10%

Reactivo	Cantidad
APS	0.1 g
dH ₂ O	1 mL

Almacenar a -20 °C hasta por 1 semana.
Agregar de 50-70 µL y 10 µL de TEMED a 20 mL de solución desnaturalizante (tiempo aproximado de polimerización 1 h).

Tabla II.4) Buffer TAE 50X.

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tris base	242.0 g	2 M
Ácido acético glacial	57.1 mL	1 M
0.5 M EDTA, pH 8	100.0 mL	50 mM
dH ₂ O	cbp 1000 mL	

Mezclar y esterilizar. Almacenar a temperatura ambiente.

Tabla II.5) Buffer de carga 2X.

Reactivo	Cantidad	Concentración final
2% Azul de bromofeno	0.25	0.05%
2% Cianol de xileno	0.25	0.05%
100% Glicerol	7	70%
dH ₂ O	cbp 10 mL	

Almacenar a temperatura ambiente.

Tabla II.6) Buffer TAE 1X. (Reutilizar hasta 2 ó 3 veces).

Reactivo	Cantidad
Buffer TAE 50X	140 mL
dH ₂ O	6860 mL
Volumen final	7000 mL

Tabla II.7) Solución para teñir gel y observar el gradiente (Dye Solution).

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Azul de bromofenol	0.05 g	6.6×10^{-2} µg/mL
Cianol de xileno	0.05 g	6.6×10^{-2} µg/mL
TAE 1x	cbp 10 mL	

Se agrega 400µL de Dye Solution a 30mL de solución desnaturante de alta densidad en el momento de la preparación del gel. La Dye Solution se almacena en refrigeración.

ANEXO III

Tinción de geles de DGGE con plata

- A) **Solución de Teñido.** Se deja actuar durante 20 minutos en agitación constante.

Reactivo	Cantidad
Etanol	15 mL
Ácido acético glacial	0.75 mL
AgNO ₃ 0.1 N	17.6 mL
dH ₂ O	cbp 150 mL

- B) **Solución de Lavado.** El lavado del gel se realiza con 150 mL de H₂O desionizada durante 20 segundos con agitación constante

- C) **Solución de Revelado.** La solución de revelado debe de ser incubada a 55°C durante 20 minutos antes de ser agregada. Se debe dejar actuar de 5 a 10 minutos (cuidando el revelado de las bandas) con agitación constante.

Reactivo	Cantidad
NaOH	4.5 g
Formaldehído	150 µL
dH ₂ O	cbp 150 mL

- D) **Solución de Paro.** Se deja actuar durante un minuto con agitación constante.

Reactivo	Cantidad
Etanol	15 mL
Ácido acético glacial	0.75 mL
dH ₂ O	cbp 150 mL

- E) **Conservación.** Se conserva en 150 mL de H₂O desionizada y recomienda realizar inmediatamente el procedimiento de selección de bandas y de extracción de ADN para obtener altos rendimientos.

ANEXO IV

Método de extracción de ADN de banda de DGGE y precipitación con disolventes

La extracción de ADN de los geles de DGGE se utilizó después del revelado de las bandas.

1. Se cortaron individualmente las bandas de interés con un bisturí estéril y se depositaron en un vial estéril de 2 mL.
2. Se agregó 50 μ L de agua desionizada, filtrada y estéril ajustada a pH 8.
3. Se incubaron a 37°C con agitación de 35x g (Thermomixer, Eppendorf) por una hora.
4. Se almacenaron las bandas por 48 horas a 4°C.
5. Se separó la fase acuosa por centrifuga a 19,064.1x g por 10 minutos.
6. Se agrega al 10% de acetato de sodio pH 5.2 al buffer extraído de la banda del gel DGGE.
7. Se añaden 2 volúmenes de etanol absoluto a 0°C.
8. Se incuba a -20°C durante 48 horas.
9. Se recupera el ADN precipitado por centrifugación a 19,064.1x g por 10 minutos.
10. Se elimina sobrenadante.
11. Se agrega 50 μ L de etanol al 70% a 0°C para eliminar el exceso de sales.
12. Se centrifuga a 19,064.1x g por 10 minutos y se elimina sobrenadante.
13. El exceso de alcohol se deja secar dejando el vial con la tapa abierta.
14. Se resuspende el ADN en 20 μ L de H₂O pH 8.

ANEXO V

Purificación de ADN a partir del gel de agarosa (System Applied Science, Roche™)

1. Aislar el producto de interés de PCR por electroforesis.
 - 1.1. Utilizar gel de agarosa al 2%
 - 1.2. Utilizar buffer TAE 1x para la electroforesis.
2. Identificar las bandas tiñendo con Bromuro de etidio.
 - 2.1. Cortar las bandas deseadas con un bisturí estéril y colocarlas en un vial de 1.5 mL estéril.
 - 2.2. Determinar la masa de gel por diferencia de pesos.
3. Adicionar 300 µL de buffer de unión por cada 100 mg de gel de agarosa
4. Disolver el gel de agarosa con el fin de extraer el ADN.
 - 4.1. Agitar el vial vigorosamente de 15 a 30 segundos para resuspender el buffer de unión.
 - 4.2. Incubar por 10 minutos a 56°C.
 - 4.3. Agitar brevemente cada 2-3 minutos de la incubación.
5. Una vez que se disolvió por completo el gel de agarosa.
 - 5.1. Adicionar 150 µL de isopropanol por cada 100 mg de gel.
 - 5.2. Agitar.
6. Insertar una columna (Hig pure filter) dentro de un tubo de colección.
 - 6.1. Transferir el contenido del vial a la columna (Hig pure filter).
 - 6.2. No exceder de 700 µL de volumen total. Si la mezcla es mayor, se divide el contenido en dos tubos con columna.
7. Centrifugar por 1 minuto a 19,064.1x g a temperatura ambiente.
 - 7.1. Eliminar sobrenadante.
 - 7.2. Reconectar la columna al mismo tubo de colección.

-
-
8. Adicionar 500 μ L de buffer de lavado.
 - 8.1. Centrifugar por 1 minuto a 19,064.1x g a temperatura ambiente.
 - 8.2. Eliminar sobrenadante.
 - 8.3. Reconectar la columna al mismo tubo de colección.

 9. Adicionar 200 μ L de buffer de lavado.
 - 9.1. Centrifugar por 1 minuto a 19,064.1x g a temperatura ambiente.
 - 9.2. Eliminar sobrenadante.
 - 9.3. Conectar la columna a un vial de 1.5 mL estéril.

 10. Adicionar 20-50 μ L de Agua grado Biología Molecular (pH 8) previamente calentada a 60°C por 10 minutos.

 11. Centrifugar por 1 minuto a 19,064.1x g a temperatura ambiente.

 12. El ADN concentrado se almacena a -20°C hasta su uso.

ANEXO VI

Caracterización colonial (Facultad de Química, UNAM, 2008)

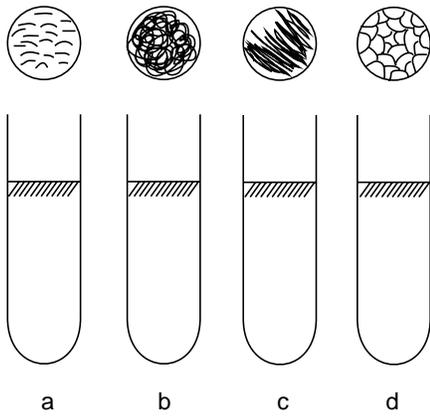


Figura VI.1.

Características culturales en medios líquidos

1. Crecimiento superficial:
 - a) **Floculento**, b) **Anillado**, c) **Películado**, d) **membranoso**.
2. Opacidad: ligera, mediana, transitoria, persistente o nula.
3. Sedimento: Compacto, grumoso, granular o viscoso.
4. Cantidad de sedimento: abundante, escaso o nulo.

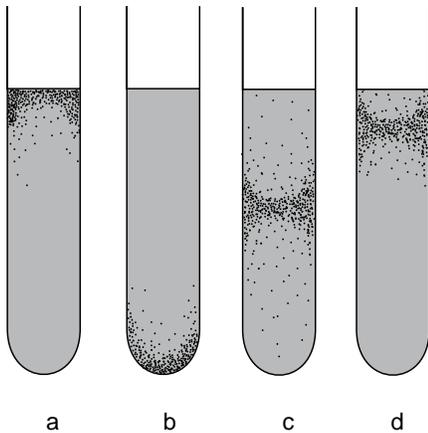


Figura VI.2.

Patrón de desarrollo característico de acuerdo a las necesidades de oxígeno.

- a) Aerobio, b) Anaerobio, c) Anaerobio facultativo, d) Microaerofílico

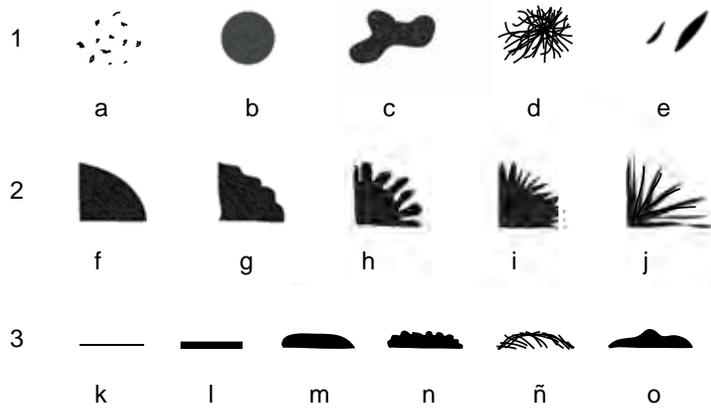


Figura VI.3.

Características morfológicas de colonias desarrolladas en placas de agar.

1. Forma: a) Puntiforme, b) Circular, c) Amiboide, d) Rizoide, e) Fusiforme.
2. Bordes: f) Entero, g) Ondulado, h) Lobulado, i) Crenado j) Filamentoso.
3. Elevación: k) Plana, l) Elevada, m) Convexa, n) Rugosa, ñ) Papilar, o) Umbonada.
4. Textura: Viscosa, membranoso, butirosa, seca.
5. Color: Blanquesino, blanco opaco, amarillo, etc.

Bacilos y formas de los extremos

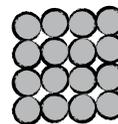
Extremos



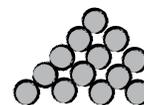
Cocobacilos
(bacilo corto)

Streptobacilo
(en cadena)

Cocos y tipos de agrupación



Sarcina



Estafilococos

Figura VI.4. Características microscópicas morfología y tipo de agrupación.

ANEXO VII

Cuantificación de ADN extraído de las muestras en diferentes medios

Tabla VI.1 Cuantificación de ADN extraído de las colonias aisladas de la muestra **SCC** en medio GYP.

Muestra / Medio	Colonia	A260/A280	ngADN/ μ L
SCC GYP	1	2.26	198.96
	2	2.61	147.66
	3	2.22	132.85
	4	2.26	203.66
	5	2.22	139.48
	6	2.28	177.30
	7	2.25	238.72

Tabla VI.2 Cuantificación de ADN extraído de las colonias aisladas de la muestra **SCC** en medio YYP.

Muestra / Medio	Colonia	A260/A280	ngADN/ μ L
SCC YYP	8	2.12	23.71
	9	2.13	34.44
	10	2.26	11.30
	11	2.15	26.13
	12	2.30	202.32
	13	2.30	157.28
	14	2.27	186.94

Tabla VI.3 Cuantificación de ADN extraído de las colonias aisladas de la muestra **SCC** en medio GYPF.

Muestra / Medio	Colonia	A260/A280	ngADN/ μ L
SCC GYPF	15	2.30	35.22
	16	2.21	49.97
	17	2.24	357.30
	18	2.26	34.73
	19	2.18	39.45
	20	2.30	150.36
	21	1.99	10.16

Tabla VI.4 Cuantificación de ADN extraído de las colonias aisladas de la muestra **SCC** en medio GYPB.

Muestra / Medio	Colonia	A260/A280	ngADN/ μ L
SCC GYPB	22	2.16	155.27
	23	2.21	143.57
	24	2.17	182.42
	25	2.10	131.34
	26	2.17	122.90
	27	2.17	177.00
	28	2.14	89.07

Tabla VI.5 Cuantificación de ADN extraído de las colonias aisladas de la muestra **SMC** en medio GYP.

Muestra / Medio	Colonia	A260/A280	ngADN/ μ L
SMC GYP	A	1.92	23.98
	B	2.27	143.09
	C	2.01	20.60
	D	1.90	20.60
	E	1.91	19.15
	F	1.98	22.04
	G	2.00	25.56

Tabla VI.6 Cuantificación de ADN extraído de las colonias aisladas de la muestra **SMC** en medio XYP.

Muestra / Medio	Colonia	A260/A280	ngADN/ μ L
SMC XYP	H	2.25	84.64
	I	2.25	40.20
	J	2.26	190.32
	K	2.20	42.07
	L	2.17	29.46
	M	2.24	72.13
	N	2.26	45.26

Tabla VI.7 Cuantificación de ADN extraído de las colonias aisladas de la muestra **SMC** en medio GYPF.

Muestra / Medio	Colonia	A260/A280	ngADN/ μ L
SMC GYPF	O	2.17	9.81
	P	2.11	18.78
	Q	2.07	19.50
	R	2.20	55.03
	S	1.97	18.89
	T	2.00	16.70
	U	1.93	24.99

ANEXO VIII

Cuantificación de ADN de los productos de PCR.

Tabla VI.1) Cuantificación de ADN de los productos de la PCR (**SCC** en GYP).

Muestra / Medio	Colonia	ngADN/ μ L
SCC GYP	1	437.57
	2	609.13
	3	393.68
	4	573.41
	5	558.94
	6	446.32
	7	422.97

Tabla VI.2) Cuantificación de ADN de los productos de la PCR (**SCC** en XYP).

Muestra / Medio	Colonia	ngADN/ μ L
SCC XYP	8	551.36
	9	621.25
	10	82.05
	11	555.30
	12	541.87
	13	483.54
	14	457.80

Tabla VI.3) Cuantificación de ADN de los productos de la PCR (**SCC** en GYPF).

Muestra / Medio	Colonia	ngADN/ μ L
SCC GYPF	15	243.90
	16	461.36
	17	305.74
	18	557.74
	19	557.74
	20	557.74
	21	231.98

Tabla VI.4) Cuantificación de ADN de los productos de la PCR (**SCC** en GYPB).

Muestra / Medio	Colonia	ngADN/μL
SCC GYPB	22	603.38
	23	449.66
	24	479.75
	25	500.20
	26	514.54
	27	375.30
	28	446.87

Tabla VI.5) Cuantificación de ADN de los productos de la PCR (**SMC** en GYP).

Muestra / Medio	Colonia	ngADN/μL
SMC GYP	A	406.55
	B	492.61
	C	362.46
	D	466.26
	E	524.78
	F	334.53
	G	458.27

Tabla VI.6) Cuantificación de ADN de los productos de la PCR (**SMC** en XYP).

Muestra / Medio	Colonia	ngADN/μL
SMC XYP	H	528.76
	I	641.78
	J	440.81
	K	354.09
	L	420.79
	M	397.31
	N	389.12

Tabla VI.7) Cuantificación de ADN de los productos de la PCR (**SCC** en GYPF).

Muestra / Medio	Colonia	ngADN/μL
SMC GYPF	O	254.96
	P	395.69
	Q	351.21
	R	476.70
	S	303.50
	T	298.39
	U	272.46

Colonia 8



Colonia 9



Colonia 11



Colonia 12



Colonia 13



Colonia 15



Colonia 16



Colonia 18



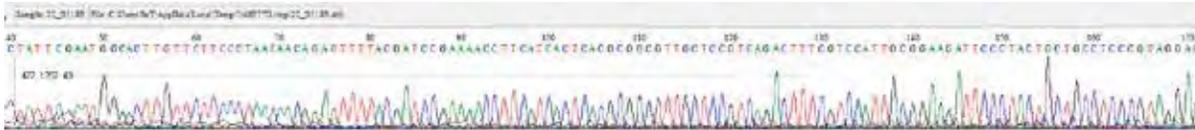
Colonia 20



Colonia 21



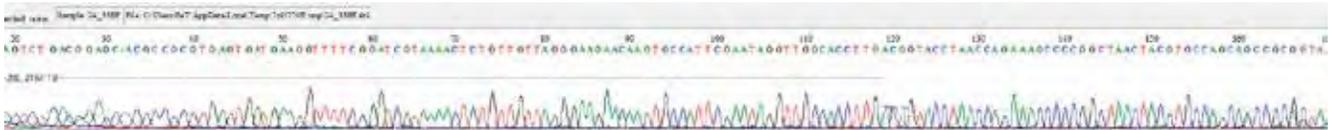
Colonia 22



Colonia 23



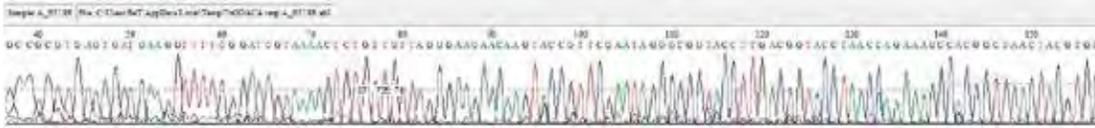
Colonia 24



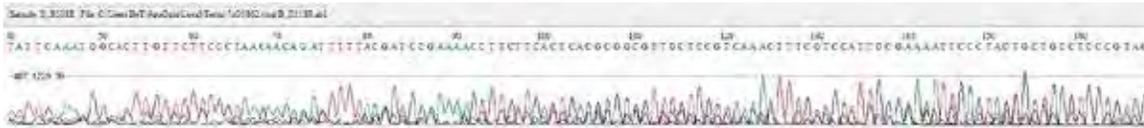
Colonia 27



Colonia A



Colonia B



Colonia C



Colonia D



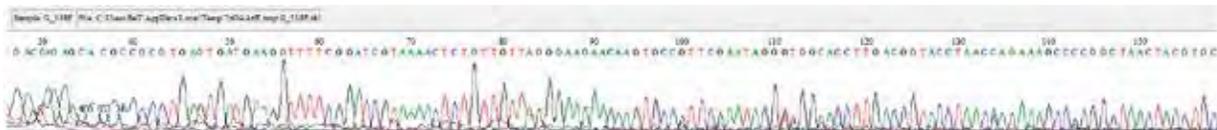
Colonia E



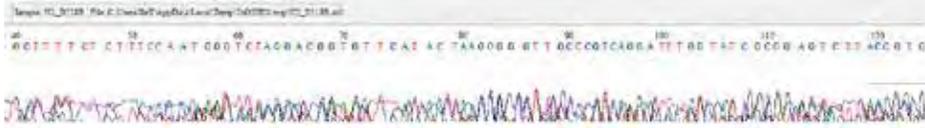
Colonia F



Colonia G



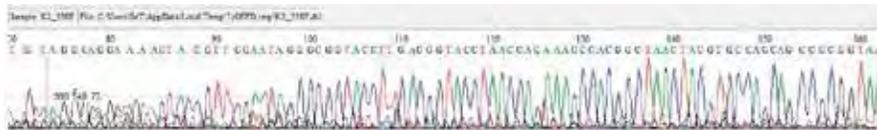
Colonia H



Colonia I2



Colonia K



Colonia L2



Colonia M



Colonia N



Colonia O



XII. BIBLIOGRAFIA

1. Ampe, F., *et al.*, 1999. Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, Demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods To Investigate Traditional Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12):5464-5473.
2. Ishikawa, M., *et al.*, 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.
3. Lück, E., *et al.*, 2000. *Conservación química de los alimentos. Características, usos, efectos*. Segunda Edición, Zaragoza: Editorial ACRIBIA, S.A., pp. 77-86.
4. Mwirchia, R., *et al.*, 2010. Isolation and characterisation of bacteria from the haloalkaline Lake Elmenteita, Kenia. *Extremophiles Springer*, 14:339-348.
5. Álvares, R., *et al.*, 2005. *Reglas de uso, Región Colectiva Queso Cotija Región de Origen*, México: Asociación Regional de Productores, pp. 12-17.
6. Amann R. & M. Kühn, 1998. In “*situ*” methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:352-358.
7. Aponte, M., *et al.* 2010. Could halophilic archaea improve the traditional salted anchovies (*Engraulis encrasicolus* L.) safety and quality? *Letters in Applied Microbiology*, 51:697-703.
8. Asociación Mexicana de la Industria Salinera A. C. en <http://www.amisac.org.mx>, consultado 10 de Marzo de 2013.
9. Bardavid, R., *et al.*, 2007. Selective enrichment, isolation and molecular detection of *Salinibacter* and related extremely halophilic Bacteria from hypersaline environments. *Saline Water Springer*, 576:3-13.

-
-
10. Cabral, E., 2010. *Efectos antropogenicos sobre calidad del agua, diversidad y abundancia de la fauna neotonica de la Laguna De Cuyutlan, Colima, México*. Tesis doctorado. CIBNOR, México.
 11. Casillas, J., 2013. *Caracterización molecular de la microbiota bacteriana del queso Cotija elaborado en diversas regiones de México*. Tesis de maestría, Facultad de Química. UNAM, México.
 12. Clustal Omega en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo> el 27 de Mayo de 2013.
 13. Cui, Y., *et al.*, 2012. Isolation of halophilic lactic acid bacteria from traditional Chinese fermented soybean paste and assessment of the isolates for industrial potential. *European Food Research and technology*, 234:797-806.
 14. Curtis, H., *et al.* 2006. *Biología*, Sexta edición, Madrid: Editorial Medica Panamericana, pp. 758-759.
 15. Deng, W., 2007. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Molecular Biology Reports*, 35:265-274.
 16. Deng, W., *et al.*, 2008. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Molecular Biology Reports*, 35: 265-274.
 17. Díaz, G., *et al.*, 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 45(1-2):30-40.
 18. Dietz, M., *et al.*, 1918. Aerobic spore-bearing bacteria in the intestinal tract of children, *Journal of bacteriology*, 4:23-44.
 19. Donnell, A., *et al.*, 1980. Characterization of *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus amyloliquefaciens* by Pyrolysis Gas-Liquid Chromatography, Deoxyribonucleic Acid-Deoxyribonucleic Acid Hybridization, Biochemical Tests, and API Systems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 30: 448-459.

-
-
20. Echigo, A., *et al.*, 2005. Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). *Saline Systems BioMed Central*, 1:8.
 21. Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal Microbiology Methods*, 56:297-314.
 22. Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S., 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Syst. Appl. Microbiol*, 24: 610–617.
 23. Essghaier, B., *et al.*, 2009. Biological control grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 106:833-846.
 24. Estrada, a., 1999. *Aspectos poblacionales de la Jaiba Callinectes arcuatus Ordway 1863, en la laguna de Cuyutlán, Colima, México*. Tesis de maestría. Universidad de Colima, México.
 25. Estrada, C., 2009. *Análisis microbiológico de queso Cotija identificación de microorganismos patógenos mediante la técnica de PCR punto final*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química. UNAM, México.
 26. Fenema, O., 2000. *Química de los alimentos*. Segunda edición, Zaragoza: Editorial ACRBIA, S.A., pp. 61.
 27. Feurer, C., Vallaey, T., Corrieu, G., Irlinger, F., 2004a. Does smearing inoculum reflect the bacterial composition of the smear at the end of the ripening of a French soft, red-smear cheese? *J. Dairy Sci.* 87, 3189–3197.
 28. Fog Moller, M., *et al.*, 2010. *Mirinirobium haloxylanilyticum sp. nv.*, a new moderately halophilic polysachcharide-degrading bacterium isolated from Great Salt Lake, Utah. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98:553-565.

-
-
29. Frazier, W., *et al.*, 2003. *Microbiología de los alimentos*. Cuarta edición, Zaragoza: Editorial ACRIBIA S.A., pp. 7-13, 50-55, 92-111 y 200.
 30. García, V., 2006. *Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija*. Tesis profesional, Facultad de Química. UNAM, México.
 31. García, V., 2010. *Detección de microorganismos lipolíticos durante las etapas de elaboración de un queso artesanal, mediante técnica moleculares*. Tesis de maestría, Facultad de Química. UNAM, México.
 32. García-Saturnino, V., *et al.*, 2010. *Polyphasic Analysis of Lipolytic Microorganisms during the Processing Stage of an Artisanal made Mexican Cheese. Innovations in Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries*, 29: 108-127.
 33. Gildberg, A., *et al.*, 2001. The Effect of Reduced Salt Content and Addition of Halophilic Lactic Acid Bacteria on Quality and Composition of Fish Sauce Made from Sprat. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, pp. 77-88.
 34. Gómez, C., 2010. *Identificación de bacterias halófilas presentes en queso cotija por métodos independientes de cultivo*. Tesis profesional. Facultad de Química. UNAM, México.
 35. Greenwood, S., *et al.*, 2005. Genetic characterization of the lobster pathogen *Aerococcus viridans* var. *Homari* by 16S rRNA gene sequence and RAPD. *Diseases of aquatic Organisms*, 63:237-246.
 36. Hedi, A., *et al.*, 2009. Studies on the Biodiversity of Halophilic Microorganisms Isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under Aerobic Conditions. *International Journal of Microbiology*, 1:7.
 37. Hernández, N., 2007. *Identificación de bacterias proteolíticas aisladas de queso Cotija, un estudio microbiológico y fisicoquímico*. Tesis de Licenciatura. UNAM, México.

-
-
38. Hui, H. *et al.*, 2006. *Ciencia y tecnología de las carnes*, México: Limusa Noriega Editores, pp. 304, 521-522.
 39. Instalación para el tratamiento de sal marina, MANFREDINI & SCHIANCHI <http://www.manfredinieschianchi.com/206-3ES-instalacion-para-tratamiento-de-sal-marino-y-mineral.htm>, consultado el 05 de Agosto de 2013.
 40. Ishikawa, M., *et al.*, 2005. *Halolactibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov. and *Halolactibacillus miurensis* sp. nov., halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria constituting a phylogenetic lineage in Bacillus rRNA group 1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:2427:2439.
 41. Ishikawa, M., *et al.*, 2006. Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. *Letters in Applied Microbiology*, 44:308-313.
 42. Jang, S., *et al.* 2011. Analysis of Microflora in Gochujang, Korean Traditional Fermented Food. *Food Science and Biotechnology*, 20: 1435-1440.
 43. Jany, J., *et al.*, 2008. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food microbiology*, 25:839-848.
 44. Jung, M., *et al.* 2010. *Salinicoccus carnicancri* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Korean fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60:653-658
 45. Kerbaugh, M., *et al.*, 1968. *Aerococcus viridans* in the Hospital Environment. *Applied Microbiology*, 16(3): 519–523.
 46. Khaled, A., *et al.*, 2008. Isolation and Characterization of Halophilic Bacteria from the Dead Sea Coast, Jordan. *Advances in Environmental Biology*, 2:63-69.
 47. Kirk, J., *et al.*, 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 169-188.

-
-
48. Kobayashi, T., *et al.*, 2004. Effect of culture conditions on lactic acid production of *Tetragenococcus* species. *Journal of Applied Microbiology*, 96:1215-1221.
 49. Kong, H., *et al.*, 2012. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Research*. 22:850–859.
 50. Kuda, T., 2009. Microbial and chemical properties of aji-no-susu, a traditional fermented fish with rice product in the Noto Peninsula, Japan. *The Japanese Society of Fisheries Science Springer*, 75:1499–1506.
 51. Kuda, T., *et al.*, 2002. Population of halophilic bacteria in salted fish products made in the Loochoo Islands, Okinawa and the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan. *Fisheries science*, 68:1265-1273.
 52. La sal de Cuyutlán, Cultura Colima en <http://www.youtube.com/watch?v=i-7yvtbJ8KE> consultado el 2 de Mayo de 2013.
 53. Larsen, H., 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective. *Microbiology Reviews*, 39: 3-7.
 54. Madigan, M., *et al.*, 2006. Brock: *Biología de los microorganismos*, Décima edición, Madrid: Person Prentice Hall, pp. 22, 28-29, 102-108, 155-160, 322, 330, 446 y 796.
 55. Margesin, R., *et al.*, 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5:73-83.
 56. México Campo a Dentro en: <http://www.mexicocampoadentro.org/sal.php> consultado el 2 de Mayo de 2013.
 57. Miambi, E., *et al.*, 2003. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 111-120.

-
-
58. Michail, M., *et al.*, 1995. Characterization of a New Lipopeptide Surfactant Produced by Thermotolerant and Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5): 1706-1713.
 59. Muyzer, G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2:317-322.
 60. Muyzer, G., *et al.*, 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73:127-141.
 61. Neysens, P., *et al.*, 2002. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *International Journal of Food Microbiology*, 88:29-39.
 62. Nieto, J., *et al.*, 1989. Survey of Metal Tolerance in Moderately Halophilic Eubacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55:2385-2390.
 63. NORMA DEL CODEX PARA LA SAL DE CALIDAD ALIMENTARIA CODEX STAN 150-1985 Rev. 1-1997.
 64. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-040-SSA1-1993, BIENES Y SERVICIOS. SAL YODADA Y SAL YODADA FLUORURADA. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.
 65. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-F-8-1988, ALIMENTOS-SAL YODATADA Y SAL YODATADA FLUORURADA-ESPECIFICACIONES.
 66. Oren, A., 2009. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*, 31: 825-834.
 67. Patricia, S., *et al.*, 2007. *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:957–967.

-
-
68. Priest, F., *et al.*, 1988. A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*, 134: 1847-1882.
69. Ramirez, R.M., *et al.*, 2008. *Manual de prácticas de microbiología general*. México: Facultad de Química, UNAM, pp. 77-97 y 147-180.
70. Rohban, R., *et al.*, 2009. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Original paper Sringer*, 36:333-340.
71. Sales del Valle S.A de C.V. en <http://www.salesdelvalle.com.mx/toque.html>, consultado el 5 de Abril de 2013.
72. Sangines, F., 1998. *Biología molecular y biotecnología*. México: Addis Wesley Logman, pp. 8-10.
73. Shu-Juan, C., *et al.*, 2008. *Halolactibacillus alkaliphilus* sp. nov., a moderately alkaliphilic and halophilic bacterium isolated from a soda lake in Inner Mongolia, China, and emended description of the genus *Halolactibacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutive Microbiology*, 58:2169-2173.
74. Sociedad Cooperativa de Salineros de Colima en http://www.sinectica.iteso.mx/assets/files/articulos/24_salineros_de_cuyutlan.pdf consultado el 7 de Mayo de 2013.
75. Temmerman, R., *et al.*, 2004. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology*, 15:348–359.
76. Ventosa, A., *et al.*, 1998. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 62(2):504–544.
77. Ventosa, A., *et al.*, 2008. Halophilic and Halotolerant Micro-Organisms from Soils. *Microbiology of Extreme soils*, pp. 87-102.

-
-
78. Wintzingerode, F., *et al.*, 1997. Determinatio of microbial diversity in envioronmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 213-229.
 79. Yoon, J., *et al.*, 2004. Transfer of *Bacillus halodenitrificans* Denariaz et al. 1989 to the genus *Virgibacillus* as *Virgibacillus halodenitrificans* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 2163–2167
 80. Yoon, J., *et al.*, 2005. *Virgibacillus dokdonensis* sp. nov., isolated from a Korean island, Dokdo, located at the edge of the East Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1833–1837.
 81. Zuñiga, B., 2009. *Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por métodos moleculares*. Tesis de maestría. UNAM, México.